

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. S. Mahner

Die Wirkung von Essigsäure und optischer Clearingmittel auf optische kohärenztomographische Aufnahmen des Zervixepithels

Ex vivo Studie an Konisationspräparaten

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anna Stanchi

aus Turin (Italien)

2017

**Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. Julia Gallwas

Mitberichterstatterinnen: Prof. Dr. med. Doris Mayr

Prof. Dr. med. Miriam Lenhard

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2017

„ Considerate la vostra semenza:
Fatti non foste a viver come bruti,
ma per seguir virtute e canoscenza.“

(Dante Alighieri, La Divina Commedia, Inferno canto XXVI, 118-120)

Meiner Familie und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung	8
1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen	8
1.1.1 Zytologische und histologische Einteilung der Präkanzerosen ...	10
1.1.2 Karzinogenese.....	13
1.2 Zervixkarzinom	16
1.2.1 Epidemiologie.....	16
1.2.2 Risikofaktoren.....	20
1.2.3 Tumorfrüherkennung.....	22
1.3 Etablierte optische Methoden der Diagnostik	27
1.3.1 Kolposkopie	27
1.3.2 Histopathologie.....	30
1.4 Optische Kohärenztomographie	32
1.4.1 Anwendung der OCT in der Gynäkologie.....	34
1.4.2 Optisches Clearing.....	37
2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	40
3. Material und Methoden	41
3.1 Patientenkollektiv	41
3.2 Technische Daten zum verwendeten OCT-Gerät	42
3.3 Verwendete Agenzien	43
3.4 Versuchsablauf	45
3.5 Datenauswertung und Statistik	47
3.5.1 Befundung der OCT-Bilder	47
3.5.2 Kontingenztabellen zum Vergleich von OCT und Histologie.....	48
3.5.3 Rating der OCT-Bilder	48
3.5.4 Vergleich der Helligkeiten durch Helligkeitsprofile	50
4. Ergebnisse.....	55
4.1 Deskriptive Statistik	55
4.1.1 Analyse des Patientenkollektivs	55
4.1.2 Analyse des Bildmaterials	56
4.2 Qualitative Bildanalyse	59
4.2.1 Ergebnisse der Kontingenztabelle für Essigsäure, DMSO und PEG	63

4.2.2	Visuelle Beurteilung der Wirkung von Essigsäure auf die OCT	65
4.2.3	Visuelle Beurteilung der Wirkung von DMSO auf die OCT	70
4.2.4	Visuelle Beurteilung der Wirkung von PEG auf die OCT	75
4.3	Quantitative Bildanalyse	79
4.3.1	Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile nach Essigsäure-Applikation	83
4.3.2	Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile nach DMSO-Applikation	89
4.3.3	Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile nach PEG-Applikation	93
5.	Diskussion	97
5.1	Diskussion von Material und Methoden	97
5.2	Diskussion der Ergebnisse	104
5.2.1	Diskussion der Ergebnisse aus der qualitativen Analyse	104
5.2.2	Diskussion der Ergebnisse aus der quantitativen Analyse	106
5.2.3	Diskussion der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile für Essigsäure	106
5.2.4	Diskussion der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile für DMSO und PEG	109
6.	Zusammenfassung und Ausblick	113
7.	Abbildungsverzeichnis	116
8.	Tabellenverzeichnis	120
9.	Literaturverzeichnis	121
10.	Danksagung	130

Abkürzungsverzeichnis

ADF-Test	Augmented Dickey-Fuller-Test
AG-CPC	Arbeitsgemeinschaft für Zervixpathologie und Kolposkopie (engl. cervical pathology and colposcopy)
ASR	Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate
AUC	Area under the curve
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
BRD	Bundesrepublik Deutschland
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia, dt. zervikale intraepitheliale neoplasie
CIS	Carcinoma in situ
CT	Computertomographie
DCO	Death certificate only
DDR	Deutsche Demokratische Republik
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECC	Endocervical curettage
Et al.	Et alii, deutsch: und andere
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration
FD-Modell	Frequency-Domain-Modell
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
H.E Färbung	Hämatoxylin und Eosin Färbung
HC2	Hybrid-Capture2-Test
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
HPV	Human papilloma virus
HSIL	High Grade squamous intraepithelial lesion
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFCPC	International federation of cervical pathology and colposcopy
IQWiG	Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen
KPSS-Test	Test nach Kwiatkowski, Phillips, Schmidt & Shin

LBC	Liquid based cytology
LEEP	Loop electrical excision procedure
LSIL	Low grade squamous intraepithelial lesion
MIT	Massachusetts Institute of Technology
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NIR	Near infrared range
OCA	Optical clearing agents
OCP	Optical clearing potential
OCT	Optical coherence tomography, dt. optische Kohärenztomographie
Pap-Test	Zytologischer Zervixabstrich, nach dem Erfinder Papanicolaou benannt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Probeexzision
PEG	Polyethylenglycol
PPV	Positive predictive value
PZG	Plattenepithel-Zylinderepithel-Grenze
Rb	Retinoblastoma
RKI	Robert Koch Institut
ROC-Analysen	Receiver operating characteristic-Analysen
SGB V	Sozialgesetzbuch fünftes Buch
SLD	Superlumineszenzdiode
TD-Modell	Time-Domain-Modell
TNM	Tumor/Nodus/Metastase
TOC	Tissue optical clearing
US	United States
VIA	Visual inspection with acetic acid
WHO	World Health Organisation
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

1. Einleitung

1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

Die Zervix uteri gehört zusammen mit den Adnexen, dem Corpus und Isthmus uteri sowie der Vagina zu den inneren weiblichen Geschlechtsorganen. Sie bildet den distalen Anteil des Uterus [1]. Die Zervix, deren Länge stark vom Alter der Frau und der Anzahl der Geburten abhängt, nimmt mit ca. 2,5-3 cm einen Drittel der Uteruslänge ein und ist über den Isthmus uteri mit dem Corpus uteri verbunden [2, 3]. Die Wand der Zervix ist im Gegensatz zu der des Corpus uteri eher muskelfaserarm und bindegewebsreich. Man unterteilt sie in Endo- und Ektozervix [4]. Sie spielt eine große Rolle beim Verschluss des Uterus während der Schwangerschaft. Durch eine Zervixinsuffizienz (Häufigkeit 1-2%) wird das Auftreten von Spätaborten und Frühgeburten begünstigt [5]. Der kaudale Pol der Zervix ragt als Portio in die Scheide hinein und bildet den äußeren Muttermund. Dieser Teil der Zervix wird als Portio vaginalis uteri, der oberhalb der Vagina liegende Anteil als Portio supravaginalis uteri bezeichnet. Der innere Muttermund befindet sich zwischen Zervix und Isthmus uteri und stellt mit 2-3mm Durchmesser die engste Stelle im Zervikalkanal dar. Am inneren Muttermund beginnt der Zervikalkanal der an der Portio vaginalis uteri mündet. Diese wird in eine vordere und hintere Muttermundslippe (Labium anterius et posterius) unterteilt [1]. Der äußere Muttermund ist bei Nulliparae grübchenförmig. Nach einer vaginalen Geburt verändert sich die Form zu einem queren Spalt [6].

Histologisch lassen sich an der Zervix uteri zwei Epithelarten differenzieren. Die Schleimhaut im Zervikalkanal (Endozervix) besitzt eine eher unregelmäßige Oberfläche mit verzweigten Falten (Plicae palmatae) und Spalten. Das Epithel dieser Schleimhaut setzt sich aus einschichtig hochprismatischem, schleimbildendem Zylinderepithel und aus vereinzelt auftretenden Flimmerzellen zusammen [4].

Die Ektozervix ist durch mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel charakterisiert. Das Plattenepithel lässt sich in 4 Schichten unterteilen:

- Superficialzellschicht
- Intermediärzellschicht
- Parabasalzellschicht
- Basalzellschicht

Das Epithel wird durch die Basalmembran scharf gegen das Stroma abgegrenzt [7]. Die Zone in der sowohl das einschichtig hochprismatische Zylinderepithel der Endozervix als auch das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel der Ektozervix aufeinandertreffen wird als Plattenepithel-Zylinderepithel-Grenze (PZG) bezeichnet. Sie ist bereits intrauterin angelegt und befindet sich in der späten Fetalphase im Zervikalkanal. Zum Geburtstermin hin verschiebt sich die PZG auf die Ektozervix (kongenitale PZG). Knapp 50 % der Mädchen weisen bereits präpubertär eine Ektopie der Zervixschleimhaut auf, die sich im Laufe der Pubertät durch die Veränderung des Uterus und unter dem Östrogeneinfluss noch weiter ausstülpt. Bei Frauen in der post- oder perimenopausalen Phase hingegen ist die adulte PZG häufig weit in den Zervikalkanal verschoben. Die Ektopie ist gegenüber äußeren Einflüssen eher empfindlich. Sie wird im Laufe des Lebens durch mehrere Faktoren, wie dem Alter, vaginal-ph, Schwangerschaften und dem hormonellen Einfluss der Sexualhormone beeinflusst. Es bildet sich eine neue, die sog. adulte PZG. Als Transformationszone wird die Fläche zwischen der kongenitalen und adulten PZG bezeichnet [8, 9]. Auf das Zylinderepithel der Transformationszone wirken chemische Einflüsse, wie der saure vaginale pH von 4, sowie hormonelle und physikalische Einflüsse, während des Lebenszyklus und der Schwangerschaft ein. Die Transformationszone stellt somit einen Ort ständiger Umbauprozesse dar. Zum einen werden entstandene Defekte durch pluripotente Basalzellen, sog. Reservezellen, die sich sowohl zu Platten- als auch zu Zylinderepithel ausdifferenzieren können, repariert. Zum anderen wird das vulnerable Zylinderepithel durch das resistendere mehrschichtige unverhornte Plattenepithel ersetzt. Dies bezeichnet man als Plattenepithelmetaplasie. Eine Reservezellhyperplasie geht häufig in eine Plattenepithelmetaplasie über. Diese ständig, physiologischerweise an der Transformationszone ablaufende Vorgänge sind in Form folgender 4 Stadien zu beobachten.

- Reservezellhyperplasie
- Unreife Plattenepithelmetaplasie
- Ausreifende Plattenepithelmetaplasie
- Reifes Plattenepithel

Sie tragen zur Überlagerung der Transformationszone bei [10, 11]. Durch die ebenfalls vorkommende Überwachsung des Zylinderepithels durch das Plattenepithel kann es zu einem Sekretstau in den Drüsen kommen, welche zystenartig anschwellen können und dann als Ovula Nabothi sichtbar werden. Die Transformationszone stellt häufig den primären Ort dysplastischer Veränderungen dar [6].

1.1.1 Zytologische und histologische Einteilung der Präkanzerosen

Dem Zervixkarzinom gehen präkanzeröse Läsionen, welche unter dem Begriff der zervikalen intraepithelialen Neoplasien (engl. Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) zusammengefasst werden, voraus. Diese entstehen vorwiegend im Bereich der oben bereits beschriebenen Transformationszone. Durch die zahlreichen hormonellen, chemischen und mechanischen Einflüsse auf die Transformationszone stellt diese eine Prädilektionsstelle zur Entstehung sowohl präinvasiver Vorstufen als auch invasiver Prozesse dar. Die vermehrte proliferative Aktivität des Gewebes macht diese Zone äußerst empfindlich für eine Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) [6]. Je nach Ausmaß der zellulären Atypien und der feingeweblichen Architekturstörung lassen sich die zervikalen intraepithelialen Neoplasien histologisch in drei Stadien einteilen. Die WHO (World Health Organisation) unterscheidet seit 2014 nur noch zwischen einer leichten und schweren Dysplasie und hat folglich die dreistufige Einteilung verlassen [12]. In Deutschland wird laut Konsultationsfassung der S3-Leitlinie „Prävention des Zervixkarzinoms“ empfohlen unter Angabe der zweistufigen WHO-Klassifikation die dreistufige Einteilung weiterhin zu verwenden [13]. Die 1966 durch Richart et. al eingeführte dreistufige CIN-Klassifikation teilt die Dysplasien in CIN 1, CIN 2 und CIN 3 (CIS, Carcinoma in situ) ein [11, 14]. 1988 wurde durch das US National Cancer Institute auf einer Konferenz das Bethesda-System vorgeschlagen, welches die Läsionen in low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) und high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) einteilt. Ursprünglich war diese als zytologische Einteilung gedacht. Nach ihr werden flache condylomatöse, durch den HP-Virus verursachte Läsionen und die CIN 1 unter LSIL zusammenfasst, während die CIN 2 und CIN 3 als HSIL bezeichnet werden [15]. Diese Klassifikationen entwickelten sich auf der Basis zu Studien der molekularen Mechanismen des HP-Virus. Dieser führt laut Richart et al. [16] in LSIL durch eine aktive Infektion zu charakteristischen Veränderungen, liegt jedoch lediglich als Plasmid (engl. Episome) im Zytoplasma der infizierten Zellen vor, während bei einer HSIL häufig bereits eine Integration der Virus DNA in das Genom der Wirtszelle stattgefunden und zur Vermehrung der viralen Oncoproteine E6 und E7 geführt hat (Abb. 1). Hier werden folglich sowohl die CIN 2 als auch die CIN 3 als obligate Präkanzerosen der CIN 1 gegenübergestellt. Die Bethesda-Klassifikation wird hauptsächlich in Nordamerika für die zytologische Befundung verwendet und spielt in der histologischen Diagnostik eine eher untergeordnete Rolle [15, 16]. In Deutschland konnte sie sich bisher nicht durchsetzen. Stattdessen findet hier zur Einteilung der zytologischen Befunde, des durch Papanicolaou und Traut in den 40er Jahren eingeführten Zellabstrichs (Pap-Test), die 1990 festgelegte und 2013 modifizierte Münchener

Nomenklatur III Verwendung, welche ab dem 1. Januar 2015 verbindlich gültig ist [17, 18]. Eine Übersicht über die verschiedenen Klassifikationen und deren Vergleich sowohl zur histologischen als auch zur zytologischen Einteilung gibt Tabelle 1.

CIN-Klassifikation	WHO-Klassifikation	Bethesda-System	Münchener-Nomenklatur III
(Histologie)	(Histologie)	(Zytologie/Histologie)	(Zytologie)
CIN 1	Leichte Dysplasie	Low-grade SIL	III D ₁
CIN 2	Schwere Dysplasie	High-grade SIL	III D ₂
CIN 3 (CIS)			IV a-p

Tab. 1: Klassifikationen zur histologischen und zytologischen Einteilung der Zervixdysplasie [18, 19].

Betrachtet man die Histologie, so findet man im gesunden Plattenepithel reifungsbedingt eine gewisse Differenzierung, die wie bereits erwähnt von der Basalmembran aus beginnend in Richtung Epitheloberfläche aus vier Schichten besteht und durch die Basalzellschicht scharf gegen das darunterliegende Stroma abgegrenzt wird. Diese für das gesunde Plattenepithel typische Zellanordnung geht beim dysplastischen Epithel, einem Gewebe mit zellulären Atypien und Architekturstörung, verloren. Der Prozess beginnt an der Basalzellschicht und involviert im Laufe der Progression immer mehr Zellen im Epithelverband bis zum Erreichen der Oberfläche (Abb. 1). Wichtig zur Abgrenzung gegenüber einem invasiven Karzinom ist dabei die Beschränkung der Veränderungen lediglich auf das Epithel und die fehlende Invasion des Stromas. Bei einer CIN 1 beschränken sich die Atypien auf das untere Drittel, während sie sich bei einer CIN 2 bis zum mittleren Drittel und bei einer CIN 3 über die gesamte Breite des Epithels erstrecken [11].

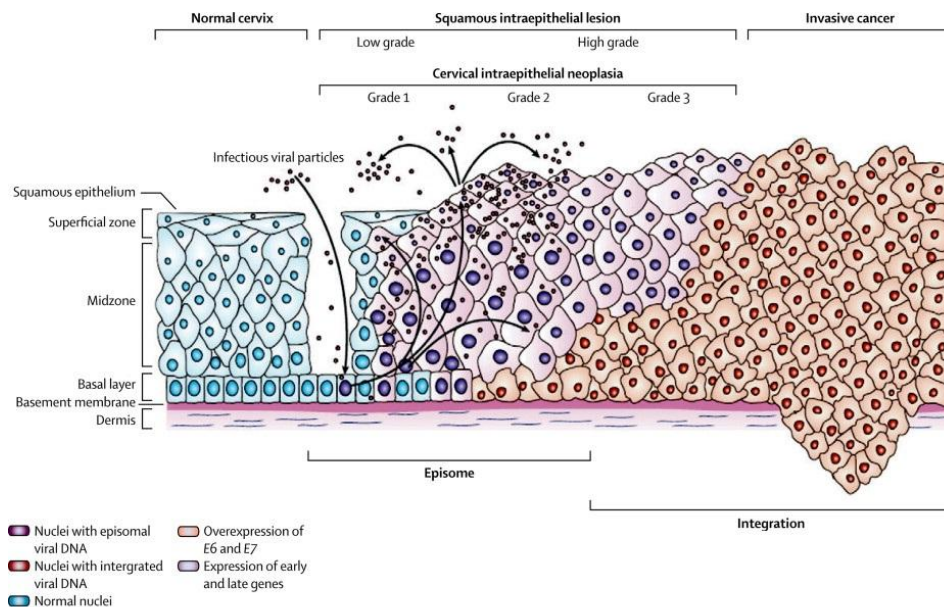


Abb. 1: Entwicklung und Progression der Zervixdysplasie und molekulare Mechanismen. Leicht modifiziert nach Woodman et al. [20]

Zytopathologisch findet man atypisch veränderte Zellen, welche Kernatypien wie Hyperchromasie, Polymorphie und Anisonukleose vorweisen. Zusätzlich liegt eine verschobene Kern Plasmarelation zugunsten des Kerns, vermehrte und teilweise auch atypische Mitosefiguren und mit zunehmendem Verlust der Zelldifferenzierung auch eine erhöhte Zelldichte vor. Ein typischer Befund bei HPV-Infektion sind die sog. Koilozyten. Dabei handelt es sich um Zellen mit perinukleärer Vakuolisierung (sog. „Halo“) und vergrößerten sowie verformten Kernen, die nicht selten auch mehrkernig sind. Bei einer CIN 3 sind Koilozyten für gewöhnlich nicht mehr anzutreffen, dafür ist jedoch die Mitoseaktivität deutlich gesteigert und man findet auch viele atypische Mitosefiguren bis in die obersten Schichten des deutlich reifungsgestörten Epithels [11]. Die CIN 2 liegt dabei vom Ausmaß der Reifungsstörungen sowie der zellulären Atypien genau zwischen der CIN 1 und der CIN 3 [19]. Während es bei einer CIN 1 in über der Hälfte der Fälle, und bei der CIN 2 in 40 % zur einer spontanen Rückbildung der Dysplasie kommt (Tab. 2), ist diese bei einer CIN 3 mit 10 % relativ selten und die Progression mit 50-70 % sowie die Entwicklung eines invasiven Karzinoms mit 12 % im Verhältnis dazu umso häufiger [21, 22]. Die CIN 3 wird daher, im Gegensatz zu den ihr vorangehenden Dysplasiestufen, als obligate Präkanzerose eingestuft. Sie fällt ebenfalls unter die Bezeichnung eines Carcinoma in situ, einer schweren Dysplasie laut WHO-Klassifikation, welche die Basalmembran noch nicht überschritten hat jedoch ein hohes Potential zur Progression besitzt und daher einer operativen Therapie bedarf [11].

Eine Ausnahme bildet die Handhabung der CIN 3 während der Schwangerschaft, bei der ein konservatives Regime mit regelmäßigen zytologischen sowie kolposkopischen Kontrollen indiziert ist [13, 23]. Laut Richart et al. [16], der WHO-Klassifikation und nach dem Bethesda-System wird die CIN 2 unter dem Begriff der HSIL mit der CIN 3 zusammengefasst. Die CIN 2 besitzt jedoch im Gegensatz zur CIN 3 mit 5% eine deutlich geringere Progressionsrate zum invasiven Karzinom und bildet sich häufiger wieder spontan zurück [15, 16].

	Spontanregression	Persistenz	Progression	Invasion
CIN I	55%	30%	15%	1%
CIN II	40%	30-40%	20-30%	5%
CIN III (CIS)	10%	20-40%	50-70%	12%

Tab. 2: Natürlicher Verlauf der verschiedenen Zervixdysplasiegrade [21, 22].

1.1.2 Karzinogenese

In den vergangenen Jahren wurde sowohl in molekularen als auch in epidemiologischen Studien bewiesen, dass die Infektion mit HP-Viren der high-risk Gruppe als karzinogen anzusehen ist. Sie stellt somit den Hauptrisikofaktor für die Entstehung von präinvasiven Vorstufen und Karzinomen der Zervix dar und ist weltweit die häufigste sexuell übertragene Infektion. Zusätzlich zur Entwicklung des Zervixkarzinoms und seiner präinvasiven Vorstufen sind die HP-Viren auch mit der Entstehung von anogenitalen Warzen und weiteren anogenitalen Karzinomen assoziiert [24, 25]. Die Karzinogenese und die Entstehung der zervikalen intraepithelialen Neoplasien lassen sich durch vier aufeinanderfolgende Schritte beschreiben. Die Infektion von metaplastischem Epithel der Transformationszone der Zervix, welche erst durch die Viruspersistenz über mehrere Jahre zu einer präinvasiven Läsion fortschreitet, kann nach einer Latenzzeit von mehreren Jahren bis Jahrzehnten, zu einem Zervixkarzinom führen [24]. Die Übertragung der HP-Viren erfolgt in erster Linie auf sexuellem Weg über Haut- und Schleimhautkontakt mit infizierten Personen. Sie kann ebenfalls, wenn auch eher selten, perinatal, digital und oral, durch Autoinokulation oder durch verunreinigtes Instrumentarium erfolgen [26]. Infektiöse Partikel der epitheliotropen HP-Viren erreichen vermutlich über kleine Risse im Schleimhautverband die noch unreife,

parabasale Zellschicht und setzen sich dort in den Zellen fest. Die meisten Infektionen mit HP-Viren sind nicht persistent und können 1-2 Jahre nach Exposition durch das körpereigene zellvermittelte Immunsystem eliminiert werden [24]. Es wurde zudem beobachtet, dass ältere HPV positive Frauen eine deutlich höhere Tendenz zur Viruspersistenz gegenüber jüngeren HPV positiven Frauen aufweisen. Dies liegt vermutlich unter anderem daran, dass ältere Frauen von zusätzlichen Infektionen belastet sind, welche das Immunsystem und somit die Elimination des HP-Virus behindern [27]. Bei jüngeren Frauen ist die HPV Infektion häufig lediglich vorübergehend, man findet jedoch weitaus häufiger einen HPV positiven Befund vor mit einem Häufigkeitsgipfel im Alter von 20-25 Jahren [19]. In einer Studie aus den USA betrug die HPV Prävalenz bei 20- bis 24- jährigen 33,8%, bei einer Viruspersistenz von 10 % [24, 28]. Laut einer HPV Screening-Studie beträgt die mediane Zeit ab Infektion bis zur Elimination des HP-Virus 6-18 Monate [29]. Dabei wird innerhalb der ersten 12 Monate eine Viruselimination in über 50% und innerhalb der ersten 1-2 Jahre in nahezu 90% der Fälle erreicht [30, 31]. Kann innerhalb dieser Zeit der HP-Virus nicht eliminiert werden, so kommt es zu einer Stagnation der weiteren Elimination und zu einer Zunahme der Progression zu präinvasiven Läsionen, wie in Abbildung 2 verdeutlicht wird.

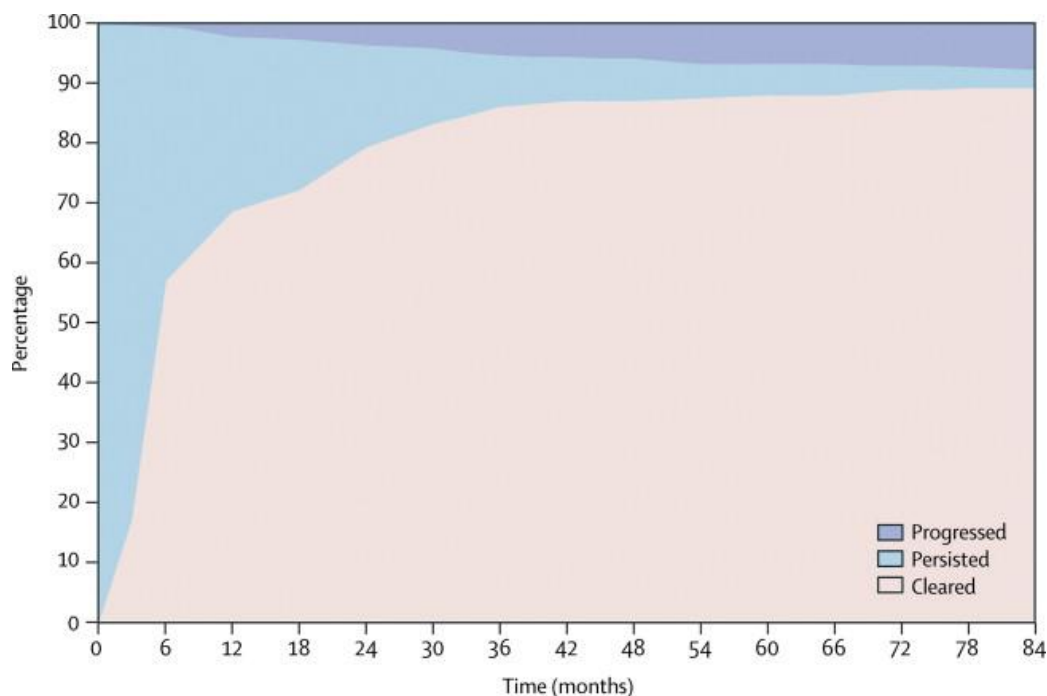


Abb. 2: Elimination, Persistenz und Progression karzinogener HPV Infektionen [24].

Ob es sich dabei um die tatsächliche Elimination des Virus aus den Wirtszellen oder eher um eine auf sehr niedrigem infektiösem Niveau fortbestehende latente HPV-Infektion handelt ist

unklar und weiterhin Bestand wissenschaftlicher Forschungen [24]. Ein Hinweis wird jedoch durch Studien gegeben, in denen HIV Patientinnen auf Infektionen mit HP-Viren untersucht wurden. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen niedriger CD4+ Zellzahl, hoher Viruslast und HPV Neuinfektionen sowohl in sexuell aktiven, als auch in sexuell inaktiven Patientinnen (kein sexueller Kontakt in den letzten 18 Monaten) nachgewiesen werden. Dies spricht folglich für eine Reinfektion durch Immuninsuffizienz bei den sexuell inaktiven Patientinnen und könnte somit möglicherweise die Theorie der fortbestehenden aber latent ablaufenden Infektion mit den HP-Viren bestätigen [32]. Bedeutsam für die Entstehung präinvasiver Läsionen und infolgedessen evtl. invasiver Prozesse ist die Persistenz des HP-Virus im Körper der Betroffenen. Umso länger die Persistenz, desto unwahrscheinlicher wird die Elimination des Virus durch immunologische Prozesse und desto wahrscheinlicher die Progression zur zervikalen intraepithelialen Neoplasie [29]. Der Grad der präinvasiven Läsion und ob diese sich zu einem invasiven Karzinom weiterentwickelt, wird in entscheidender Weise durch die molekularen Mechanismen und die Art des Virus beeinflusst. Persistiert der HP-Virus in aktivem Zustand im Zytoplasma der infizierten Zellen, ohne sich in deren Genom zu integrieren, resultieren daraus vorwiegend leichte Dysplasien im Sinne einer CIN 1 oder Low-grade SIL. Der HP-Virus repliziert sich dabei aktiv im Zytoplasma der Zellen und führt zu den oben beschriebenen, charakteristischen Zellveränderungen. Wird die Virus DNA jedoch in das Genom der Wirtszelle integriert, kommt es zur neoplastischen Transformation der infizierten Zellen. Durch die Überexpression der viralen Oncoproteine E6 und E7 und deren Komplexierung mit den Proteinen p53 und Retinoblastoma Protein (Rb), welche in der Apoptose der Zellen und dem Zellzyklusarrest eine zentrale Rolle spielen, erlangen die infizierten Zellen eine gewisse Instabilität des Genoms. Diese Mechanismen spielen sich bei Infektionen mit HP-Viren der high-risk Gruppe ab [33]. Die Latenzzeit zwischen der Infektion mit dem HP-Virus und der Entstehung mikroskopisch erfassbarer zervikaler intraepithelialer Neoplasien beträgt ca. 5 Jahre [34]. Zervikale intraepitheliale Neoplasien sind weitaus häufiger als die das invasive Zervixkarzinom, was darauf hinweist, dass nur eine sehr geringe Anzahl der präinvasiven Läsionen zur Invasion überschreitet. Die Latenzzeit zwischen der Infektion und der Entstehung eines invasiven Zervixkarzinoms ist aus ethischen Gründen schwer zu untersuchen, da beim Vorliegen einer schweren Dysplasie die Indikationsstellung zur operativen Therapie befolgt werden muss und somit der natürliche Verlauf der präinvasiven Läsion nicht bis zur Entstehung eines invasiven Karzinoms beobachtet werden kann [24, 35]. Sie beträgt jedoch schätzungsweise ca. 15 Jahre [36].

1.2 Zervixkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Zervixkarzinom ist weltweit mit einer Inzidenz von über 500 000 Neuerkrankungen und einer Mortalität von ca. 266 000 nach dem Brustkrebs, dem kolorektalen und dem Lungenkarzinom das vierthäufigste Karzinom der Frau. Betrachtet man die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate (ASR) so liegt das Zervixkarzinom mit 14 Neuerkrankungen pro 100 000 Frauen pro Jahr (Weltstandard) sogar an dritter Stelle in der Weltrangliste. 85% der Neuerkrankungen entfallen dabei auf Frauen in Entwicklungsländern und machen dort fast 12% der Karzinome aus [37]. Die 5-Jahres-Prävalenz liegt weltweit bei ca. 1,5 Millionen [37, 38]. Bei 80% der Zervixkarzinome handelt es sich um Plattenepithelkarzinome, während Adenokarzinome einen Anteil von 20% ausmachen. Zusätzlich gibt es seltene Tumoren wie das adenosquamöse Karzinom oder unspezifische epitheliale Tumoren [39, 40]. Die ASR geht von einer standardisierten Altersstruktur aus und macht Länder mit unterschiedlichen Altersverteilungen miteinander vergleichbar. Abbildung 3 zeigt, dass die ASR in den Entwicklungsländern deutlich über der der restlichen Welt liegt [37].

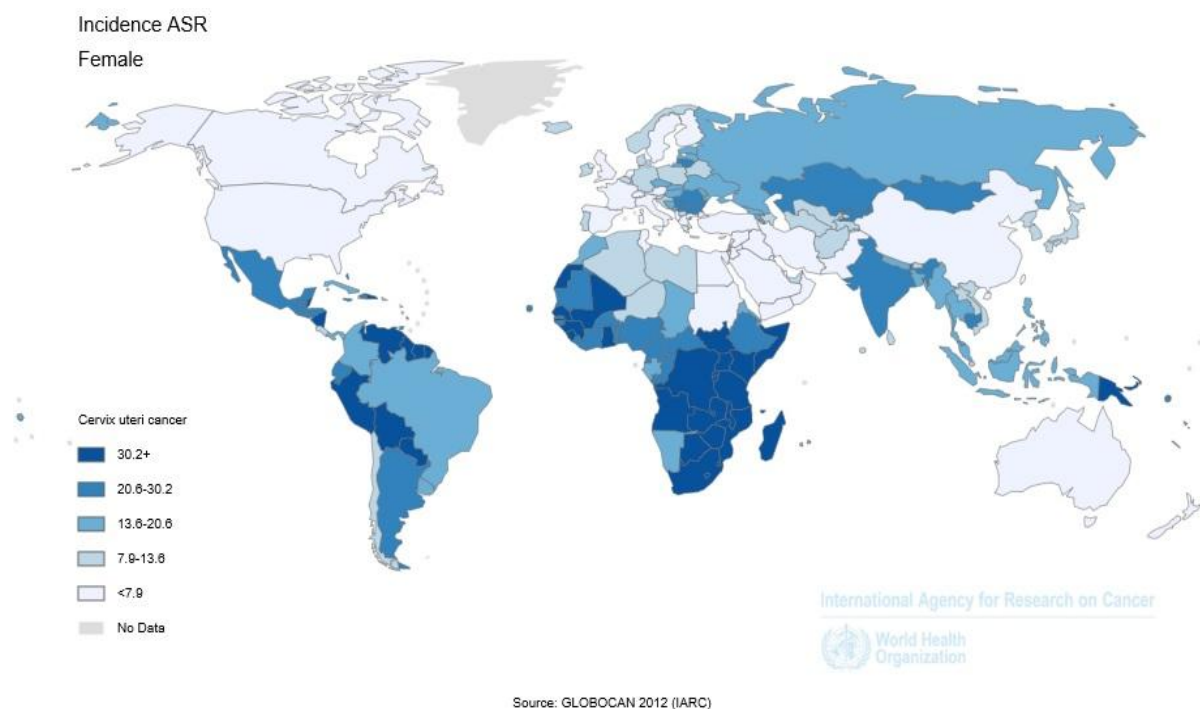


Abb. 3: Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate (Weltstandard) des Zervixkarzinoms pro 100 000 pro Jahr, weltweit, Daten der International Agency for Research on Cancer (IARC) [37].

Laut aktueller Daten des Robert Kochs Instituts (RKI) von 2012 erkrankten in Deutschland jährlich etwa 4600 Frauen am Zervixkarzinom, von denen wiederum ca. 1.600 an der Erkrankung verstarben [41]. Vor 30 Jahren verstarben noch über doppelt so viele erkrankte Frauen [39]. Die ASR (Europastandard) lag im Jahr 2012 bei 9,3 Erkrankungsfällen pro 100.000 Frauen pro Jahr. Das Zervixkarzinom liegt mit einem Anteil von 2,1 % an der Gesamtinzidenz der Malignome deutschlandweit auf Platz 12 in der weiblichen und auf Platz 4 der gynäkologischen Tumorerkrankungen. Die 5-Jahres-Prävalenz beträgt in Deutschland 17.900 [41]. Die Erkrankungsraten zeigen zwei Altersgipfel mit gehäufte Inzidenz bei Frauen zwischen 40–59 und einer erneuten Zunahme der Neuerkrankungen ab 65, die mit dem Alter kontinuierlich ansteigt (Abb. 4) [42, 43].

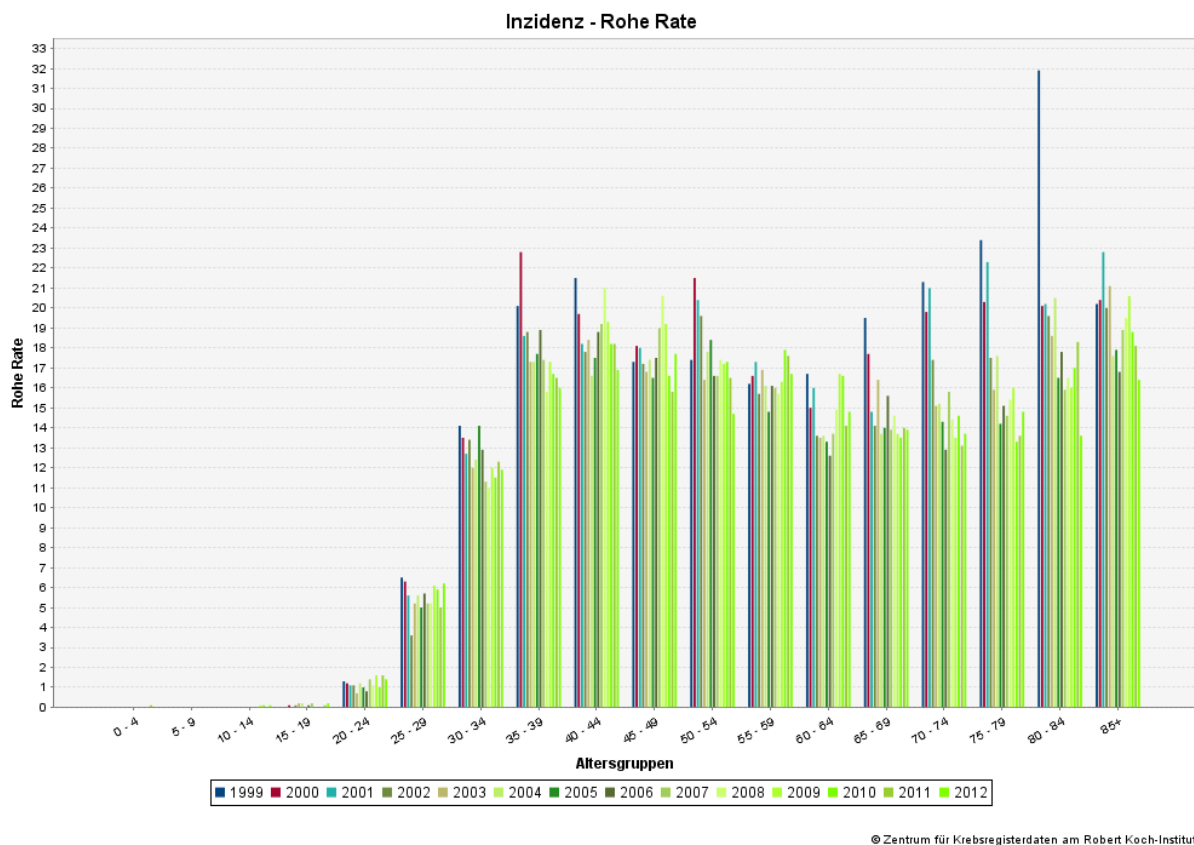


Abb. 4: Rohe Inzidenzrate pro 100 000 Einwohner in Deutschland. Altersgruppen 0-85+, Jahre 1999-2012, Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert Koch-Institut (RKI) [43].

Laut dem Robert Koch Institut (RKI) beträgt das mittlere Erkrankungsalter für das bereits invasive Zervixkarzinom 53 Jahre und liegt somit 16 Jahre unter dem allgemeinen Krebserkrankungsalter von 69 Jahren. Das in situ Karzinom (CIN 3) tritt im Mittel schon mit 34 Jahren auf, und ist zwei- bis dreimal häufiger als das invasive Zervixkarzinom [41]. Die

zervikalen intraepithelialen Neoplasien werden zunehmend bei Frauen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren beobachtet, was auch ein Ergebnis des über die Jahre verbesserten Früherkennungsprogramms ist [44].

Seitdem 1971 die Krebsfrüherkennungsuntersuchung eingeführt wurde zeigte die Inzidenz bis Mitte der 1980er Jahre eine rückläufige Tendenz. Sie ist jedoch seither weitgehend konstant geblieben, während die Mortalität weiterhin geringfügig abnimmt (Abb. 5). Aktuell liegt die altersstandardisierte Mortalitätsrate (Europastandard) in Deutschland bei 2,6 pro 100 000 Frauen pro Jahr [41].

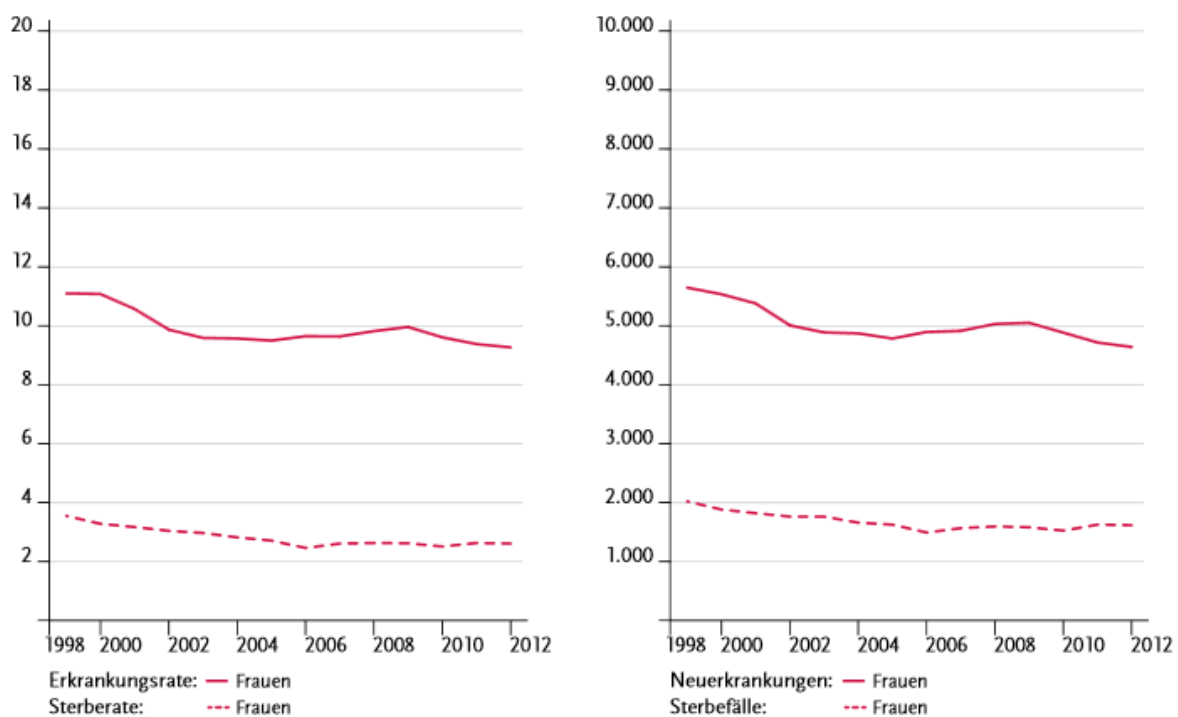


Abb. 5: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten (Europastandard) pro 100 000 (links) und absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle (rechts) in Deutschland 1999 bis 2012, Daten der deutschen Krebsregister [41].

Die Prognose des invasiven Zervixkarzinoms hat sich gegenüber 1980 ebenfalls deutlich verbessert und zeigt heute eine relative 10-Jahres-Überlebensrate von 65 % [41]. Die Verbesserung des Überlebens ist laut Beobachtung des Tumorregisters München stadienunabhängig und kann folglich nicht auf eine verbesserte Therapie, sondern vielmehr auf eine Verbesserung der Früherkennung des Zervixkarzinoms zurückgeführt werden. Dies ist wahrscheinlich der Grund für die Verschiebung der Stadien bei Erstdiagnose hin zu weniger weit fortgeschrittenen Tumoren. In der Tat zeichnete sich im Laufe der letzten 30

Jahre eine deutliche Zunahme des FIGO Stadiums I (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) bei Erstdiagnose des Zervixkarzinoms zu Ungunsten der Stadien II, III und IV ab [19]. Die FIGO Stadien IA und IB (TNM Stadium T1) machen aktuell rund 61% der Stadien bei Erstdiagnose aus, während auf die Stadien IIA, IIB (TNM Stadium T2) 25%, auf das Stadium IIIA, IIIB (TNM Stadium T3) 8% und auf das Stadium IVA, IVB (TNM Stadium T4) 6% der Fälle entfallen. Dies wird durch Abbildung 6 nochmals verdeutlicht [41].

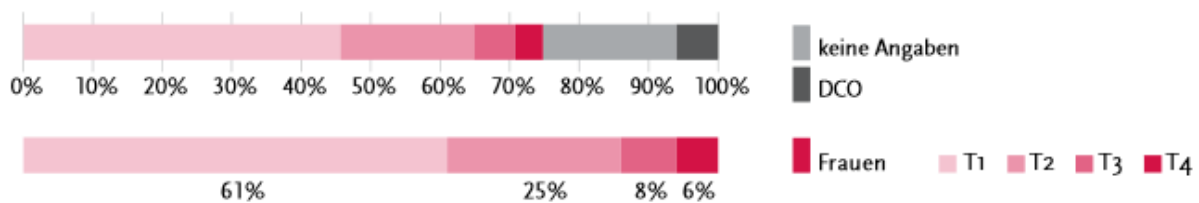


Abb. 6: Tumorstadienverteilung (TNM-Klassifikation) bei Erstdiagnose, Deutschland, 2011-2012, Daten der deutschen Krebsregister [41].

Oben: Mitberücksichtigung der Fälle mit fehlenden Angaben oder lediglich mit Information aus dem Totenschein (Death Certificate Only, DCO), unten: Nur die gültigen Werte .

Die deutsche Population setzt sich derzeit aus ca. 40 Millionen Frauen zusammen, welche unter einem kumulativen Erkrankungsrisiko von 0,7% stehen. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum zwischen 0-74 Jahren an einem Zervixkarzinom erkrankt, 0,7% hoch ist. Entsprechend dazu beträgt das kumulative Mortalitätsrisiko für Frauen in Deutschland 0,2% [42]. Laut Hochrechnungen der WHO sind in Deutschland im Jahre 2035 4853 Neuerkrankungsfälle und 1767 Sterbefälle an Zervixkarzinom zu erwarten. Diese Zahlen beruhen auf einer Schätzung der zukünftigen deutschen Population unter Berücksichtigung des demographischen Wandels durch die United Nations (World Population Prospects: The 2012 Revision), dabei wird die Annahme vorausgesetzt, dass die aktuellen Inzidenz- und Mortalitätsraten unverändert bleiben [37].

Das Bestreben nach weiterer Verbesserung der Diagnostik, Früherkennung und Therapie ist nach wie vor von großem wissenschaftlichem Interesse und bedarf noch zahlreicher zukünftiger Bemühungen.

1.2.2 Risikofaktoren

Der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ging 2008 an den deutschen Virologen Harald zur Hausen, der durch seine Forschung in den späten 70er bis frühen 80er Jahren stark zu der Erkenntnis beigetragen hat, dass eine kausale Beziehung zwischen der Entstehung des Zervixkarzinoms und der Infektion mit karzinogenen HP-Viren besteht [45-47]. Von den über 100 bekannten HP-Viren sind 40 Subtypen spezifisch für Infektionen des anogenitalen Trakts und tragen je nach Subtyp und Persistenz in unterschiedlichem Maße zu den neoplastischen Veränderungen des Genitale bei [48]. Die HPV-Subtypen lassen sich in 3 Gruppen einteilen. Die HP-Viren der low-risk Gruppe sind vorwiegend für die Entstehung von leichten Dysplasien (CIN I) und vor allem von anogenitalen Warzen, sog. „condylomata acuminata“ verantwortlich. Diese 15 Virussubtypen führen selten zur Integration der Virus-DNA in das Genom der Wirtszelle. Ihre Persistenz ist eher unwahrscheinlich und das Malignitätspotential ist damit sehr gering [49, 50]. Die HPV-Subtypen 6 und 11 gehören zu ebendieser low-risk Gruppe, sie verursachen ca. 10% der leichten Dysplasien und 90 % der Genitalwarzen [51]. Bei den zur high-risk Gruppe zusammengefassten 12 HPV-Typen gilt ein Zusammenhang mit der Entstehung hochgradiger Dysplasien bzw. Karzinomen als gesichert, während für 13 HPV-Typen eine Beteiligung vermutet werden kann [49]. Eine Übersicht über die Einteilung der HP-Viren und deren zugehörigen Subtypen gibt Tabelle 3.

High-risk HPV-Gruppe	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59
Vermutete high-risk HPV-Gruppe	26,30,34,53,66,67,68,69,70,73,82,85,97
Low-risk HPV-Gruppe	6,11,40,42,43,44,54,61,62,70,71,72,74,81,83

Tab. 3: Einteilung der HP-Viren und zugehörige Subtypen [49, 50].

Die Viren der high-risk Gruppe besitzen ein deutlich höheres Malignitätspotential als die der low-risk Gruppe. Sie tragen daher vorwiegend zur Entstehung mittlerer bis schwerer Zervixdysplasien (CIN II-III) bei und begünstigen sowohl die Progression zu schweren Dysplasien, als auch die Entstehung invasiver Karzinome. Bei Frauen mit unauffälligem zytologischem Befund, die jedoch mit HPV infiziert sind, ist weltweit gesehen die Prävalenz von HPV-16 am höchsten, dicht gefolgt von HPV 18. Diese zwei high-risk Subtypen sind zu 25% für die Entstehung von leichten und zu 50-60% von schweren Dysplasien verantwortlich. Über 70% der invasiven Zervixkarzinome werden gemeinsam von diesen beiden HPV-

Subtypen verursacht [25, 51]. In einer internationalen Studie, in der über 30 000 invasive Zervixkarzinomfälle auf die Verteilung der HPV-Subtypen hin untersucht wurden ergab sich folgendes Verteilungsmuster [52]:

Plattenepithelkarzinom: HPV 16 (59%), 18 (13%), 58 (5%), 33 (5%), 45 (4%)

Adenokarzinom: HPV 16 (36%), 18 (37%), 45 (5%), 31 (2%), 33 (2%)

Die Prävalenz von HPV variiert weltweit zwischen 2% und 44% und ist bei jungen, sexuell aktiven Frauen am höchsten [53]. Das Risiko sich im Laufe des Lebens, bis zu einem Alter von 50 Jahren, mit einem oder mehreren HPV-Viren zu infizieren liegt unter sexuell aktiven Frauen bei 80% [54]. In 90% der Fälle kommt es jedoch innerhalb von 1-2 Jahren zur Viruselimination [31]. Der HPV-Subtyp und die damit verbundene Persistenzwahrscheinlichkeit stellen intern das Hauptrisiko zur Entwicklung von Neoplasien dar. Der HP-Virus vom high-risk Typ lässt sich in 99,7% der invasiven Zervixkarzinome und in 90% seiner Vorstufen nachweisen, ein HPV negativer Befund ist in beiden Fällen äußerst selten [55, 56]. Die Infektion mit HPV wird folglich als notwendig zur Entwicklung des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen angesehen [53]. Das sexuelle Verhalten von Frauen und ihrer Partner korreliert direkt mit dem Risiko einer HPV Infektion. Das Risiko steigt dabei mit der Häufigkeit der wechselnden, sowie der Anzahl an Sexualpartnern deutlich an. Die Tatsache, dass nicht alle HPV positiven Frauen notwendigerweise ein Zervixkarzinom oder eine zervikale intraepitheliale Neoplasie entwickeln, legt nahe, dass zusätzliche externe Risikofaktoren eine modulierende Rolle spielen. Diese Risikofaktoren sind nicht zwingend als unabhängig zu betrachten, sondern stellen oftmals Kofaktoren zur Aquirierung und Förderung der Persistenz von HPV-Infektionen dar. Junges Alter bei Kohabitarche, niedriger sozioökonomischer Status, Multiparität sowie der Gebrauch oraler Kontrazeptiva stehen mit dem Sexualverhalten eng in Verbindung und beeinflussen somit auch die Wahrscheinlichkeit einer Ansteckung mit HPV und die daraus resultierenden Folgen [40]. Der negative Einfluss der Pille scheint mit der Einnahmedauer bei HPV positiven Frauen zu korrelieren, wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert [57]. Die Infektion mit Herpes genitalis Typ 2 und Chlamydien wird ähnlich wie die „Pille“ eher als Surrogatmarker für die Exposition gegenüber HPV betrachtet, spielt aber womöglich eine immunmodulatorische Rolle bei der Viruspersistenz. Gleiches gilt für die Immunsuppression allgemein durch Medikamente oder bei HIV Patientinnen [40]. Das Zigarettenrauchen und die Intensität des Rauchens konnten laut einer Studie als unabhängige mutagene Faktoren zur Entwicklung von zervikalen

intraepithelialen Neoplasien II-III identifiziert werden [58]. Es konnte eine mögliche protektive Wirkung von Ernährungsfaktoren, z.B. bei Folsäuresupplementierung, sowie eine niedrigere Neuerkrankungsrate an Zervixkarzinom unter Frauen mit circumzisierten Partnern beobachtet werden, auch wenn sie noch nicht zur Gänze wissenschaftlich geklärt ist [24, 59]. Ebenfalls noch unklar ist die Rolle der Human leukocyte antigen Merkmale (HLA-Merkmale) als genetische Kofaktoren und die womöglich damit verbundene erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer HPV Infektion und Persistenz [60].

1.2.3 Tumorfrüherkennung

Das invasive Zervixkarzinom gehört zu den wenigen Tumorarten, die sich aufgrund ihres biologischen Verhaltens besonders gut zur Früherkennung eignen. Es besitzt eine lange präklinische Phase, in der die asymptomatischen Patienten häufig schon zytologische Veränderungen bis hin zu Vorstadien des invasiven Zervixkarzinoms vorweisen. Werden diese Veränderungen durch die geeignete Untersuchung früh genug erfasst, kann durch verschärfte Kontrolle oder, falls indiziert, durch Therapie die Progression der Präkanzerose und die Entwicklung eines invasiven Zervixkarzinoms in so gut wie allen Fällen verhindert werden. Die oft relativ lange Latenzzeit zwischen der Infektion mit HPV und der Entwicklung eines invasiven Zervixkarzinoms über die vorangehenden Präkanzerosen, den zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN I-III), gibt dem Untersucher meistens genügend Spielraum zur Früherkennung und der sich eventuell aus dem Befund heraus ergebenden Therapienotwendigkeit. Zu diesem Zweck wurde 1971 die jährliche kostenlose gynäkologische Krebsvorsorgeuntersuchung für Frauen ab dem 20. Lebensjahr in den Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenversicherungen (GKV) aufgenommen (§25, Abs. 2, SGB V, 2000b) und 1991 auch auf die neuen Bundesländer ausgedehnt [19]. Das Screening konzentriert sich dabei auf die zytologische Erfassung von Zellveränderungen durch die Exfoliativzytologie, welche laut GKV derzeit das einzige anerkannte Screeningverfahren darstellt. Folgende Untersuchungsschritte sind im Rahmen der Früherkennungsuntersuchung gesetzlich vorgegeben [61]:

- Anamnese
- Gezielte zytologische Abstrichentnahme unter Spiegeleinstellung von der Portio-Oberfläche und dem Zervikalkanal mittels Spatel und Bürste, bestenfalls unter kolposkopischer Kontrolle
- Fixierung des gewonnenen Abstrichs zur späteren zytologischen Untersuchung und Standardfärbung nach Papanicolaou

- Qualitätsbewertung des Abstrichs durch das zytologische Labor unter Angabe des Vorhandenseins bzw. Fehlen von Zellkomponenten der Transformationszone
- Inspektion der Hautregion im Genitalbereich und bimanuelle gynäkologische Untersuchung
- Mitteilung von pathologischen Befunden und Besprechung der weiteren Vorgehensweise

Die Befundklassifikation des zytologischen Abstrichs erfolgt in Deutschland, wie in Tabelle 4 dargestellt, gemäß der III. Münchner Nomenklatur [18].

Gruppe	Zytologischer Befund	Empfehlung
I	Unauffällige und unverdächtige Befunde	Abstrich im Vorsorgeintervall
II-a	Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese	Ggfs. zytologische Kontrolle
II	Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert	
II-p	Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei einer CIN 1, auch mit koilozytarem Zytoplasma/Parakeratose	Ggf. zytologische Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund, evtl. nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung.
III	Unklare bzw. zweifelhafte Befunde	
III-p	CIN 2/CIN 3/Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen	Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden, evtl. kurzfristige zytolog. Kontrolle nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung.
III D	Dysplasiebefunde mit größerer Regressionsneigung	
III D ₁	leichte Dysplasie, analog CIN 1	zytologische Kontrolle in 6 Monaten, bei Persistenz > 1 Jahr ggf. additive Methoden, Differentialkolposkopie
III D ₂	mäßige Dysplasie, analog CIN 2	zytologische Kontrolle in 3 Monaten, bei Persistenz > 6 Monate Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden
IV	Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms	Differentialkolposkopie und Therapie
IVa-p	Schwere Dysplasie/Carcinoma in situ, analog CIN 3	
IVb-p	CIN 3, Invasion nicht auszuschließen	
V	Malignome	Weiterführende Diagnostik mit Histologie und Therapie
V-p	Plattenepithelkarzinom	

Tab. 4: Ausschnitt aus der gynäkologischen Zytodiagnostik nach der III. Münchner Nomenklatur und entsprechende Empfehlungen [18].

Nach Einführung der gesetzlichen Krebsvorsorgeuntersuchung ließ sich ein deutlicher Rückgang der Inzidenz des Zervixkarzinoms in Deutschland beobachten. 1966 lag die Inzidenz sowohl in der BRD als auch in der DDR bei ca. 36 Neuerkrankungen pro 100 000 Frauen im Jahr und war damit in etwa doppelt so hoch wie in den meisten anderen europäischen Ländern. Der Erfolg des Früherkennungsprogramms ließ sich in Deutschland aufgrund des ausgeprägten prozentualen Inzidenzrückgangs um 66 % auf 12 Neuerkrankungen pro 100 000 im Jahre 1996 (2012 waren es laut RKI nur noch 9,3), besonders gut beobachten [41, 61]. Die Langzeiteffektivität der zytologischen Krebsfrüherkennung wurde bisher jedoch in keiner randomisierten Screeningstudie belegt [19]. Über zwei Drittel der verbliebenen Restinzidenz ist heutzutage auf Frauen zurückzuführen, welche die Vorsorgeuntersuchung entweder gar nicht oder nur unzureichend wahrnehmen. Da es sich bei der Krebsfrüherkennungsuntersuchung um ein opportunistisches Screening handelt, erfolgt die Teilnahme daran auf freiwilliger Basis. Aktuelle Kennzahlen aus dem Jahr 2009 konnten bei etwa 30 Millionen untersuchungsberechtigten Frauen in Deutschland eine jährliche Teilnahmerate von 50 % und eine kumulierte Teilnahmerate über 3 Jahre von 79 % verzeichnen [61]. Die Exfoliativzytologie ist im Moment das effektivste verfügbare Screeningverfahren. Die in zahlreichen Studien ermittelte Sensitivität eines einzelnen Abstrichs liegt im Mittel bei ca. 58 % und die Spezifität bei 69 %, wobei eine hohe Variabilität von 11-99 % für die Sensitivität und von 14-97 % für die Spezifität zwischen den verschiedenen Studien vorliegt [62]. Es wird also in etwa nur jede zweite erkrankte Frau auch als solche erkannt, während das Erfassen tatsächlich gesunder Patientinnen geringfügig besser ist [62]. Diese Problematik ist zu 65 % auf Fehler bei der Abstrichentnahme, dem Ausstreichen und der Fixierung auf dem Objektträger sowie zu einem Drittel auf fehlerhafte zytologische Befundung zurückzuführen [19]. Trotz der Bemühungen zur Standardisierung und Qualitätssicherung des Verfahrens durch die Leitlinien der Bundesärztekammer bleiben die Fehlerquellen und interindividuellen Unterschiede in der Durchführung und Befundung durch den Untersucher bis zu einem gewissen Grad bestehen. Durch Abstrich-Wiederholung lassen sich die Gütekriterien des Tests jedoch erhöhen. Die Dünnschichtzytologie (engl. „liquid based cytology“, LBC) stellt ein alternatives zytologisches Verfahren zur konventionellen Zytologie dar. Zwei dieser Verfahren, Thin Prep (der Firma Cytyc) und Sure Path (der Firma Tripath), haben derzeit eine Zulassung durch die Food and Drug Administration (FDA) [19]. Eine Metaanalyse aus 24 Studien, in der das Thin Prep Verfahren mit der konventionellen Zytologie verglichen wurde, ergab nur eine minimal höhere Sensitivität der Dünnschichtzytologie bei vergleichbarer Spezifität und einer niedrigeren Rate

an unklaren Befunden [63]. Ein 2011 veröffentlichter und für das US-Gesundheitsministerium in detaillierter und unabhängiger Weise erstellter Bericht, zeigte keinerlei Vorteile der Dünnschichtzytologie bezüglich Sensitivität, Spezifität und Dysplasieerfassung gegenüber der konventionellen Zytologie [64]. Von Vorteil ist jedoch die Möglichkeit der simultanen oder nachträglichen Durchführung eines HPV-Tests, z.B. nach einem pathologischen Zytologiebefund, am selben Präparat [19]. Die Dünnschichtzytologie stellt einen erhöhten Kostenfaktor gegenüber der konventionellen Zytologie dar und wurde daher aufgrund der nicht ausreichenden Evidenz einer besseren klinischen Effektivität 2006 vom Gemeinsamen Bundesausschuss (G-BA) als Methode der Früherkennungsuntersuchung für das Zervixkarzinom abgelehnt [61]. Weitere Methoden der Tumorerkennung, die in Deutschland etabliert, jedoch nicht standardmäßig zum gesetzlichen Screening gehören, sind die HPV Testung, die Kolposkopie und die Biopsieentnahme zur histopathologischen Untersuchung. Auf die letzteren beiden Methoden, welche zur optischen Diagnostik gehören, soll erst im folgenden Kapitel genauer eingegangen werden.

In der Diskussion um die Optimierung des Screeningprogramms ist, seit der Entdeckung eines kausalen Zusammenhangs zwischen HPV und der Entstehung eines Zervixkarzinoms bzw. seiner Vorstufen die Einführung einer Kombination oder gar der Ersatz der konventionellen Zytologie durch eine molekulare Nachweismethode des HP-Virus ein zentrales Thema. Es existieren mehrere molekulare Nachweisverfahren zur Detektion einer HPV Infektion. Am weitesten verbreitet sind die sog. DNA-Tests. Sie weisen entweder durch nicht amplifizierende Methoden wie der Hybridisierung oder durch Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die HPV-DNA nach. Fünf Nachweisverfahren besitzen zurzeit eine Zulassung durch die FDA [65]. Der Hybrid-Capture-II-Test (HC2, Qiagen) ist im alltäglichen klinischen Einsatz am gebräuchlichsten. Er liefert mittels Hybridisierung von RNA-Sonden mit HPV-DNA den Nachweis ob mindestens eines der high-risk HPV-Typen vorhanden ist. Durch Kreuzreaktionen können ebenfalls einige low-risk Typen detektiert werden, ein Einzelnachweis ist jedoch nicht möglich. Die kürzlich zugelassenen Cervista HPV HR- sowie Cervista HPV 16/18-Tests (Hologic) funktionieren nach dem gleichen Prinzip, wobei durch letzteren der Einzelnachweis von HPV 16 und 18 gewährleistet ist. Der ebenfalls durch die FDA zugelassene cobas HPV-Test (Roche) ist ein PCR-Verfahren, während der APTIMA-Test (Gen-Probe) auf dem Nachweis der mRNA-Expression viraler Onkogene beruht. Der im Screeningprogramm zum Einsatz kommende Pap-Test besitzt eine deutlich geringere Sensitivität im Vergleich zum HPV-Test und bedarf daher der häufigen Wiederholung. Die hohe Sensitivität des HPV-Tests beruht auf der Tatsache, dass fast alle

Karzinome und Dysplasien von den high-risk Typen des HP-Virus ausgelöst werden und daher auch die Virus-DNA enthalten [65, 66].

In einer Studie zur Beurteilung der HPV-Testung durch das Hybridisierungsverfahren konnte für die Detektion von CIN II/III eine Sensitivität von 90 % bei einer Spezifität von 55 % nachgewiesen werden. Liegt folglich ein HPV-negativer Befund vor, so ist das Erkrankungsrisiko sehr gering [67]. Der Test besitzt jedoch eine niedrigere Spezifität als die konventionelle Zytologie, was darauf zurückzuführen ist, dass zahlreiche Frauen, vor allem im Alter zwischen 20 und 25 Jahren einen HPV-positiven Befund vorweisen, es sich bei den meisten jedoch lediglich um eine harmlose transiente Infektion handelt, die sich nur sehr selten zu einem Karzinom weiterentwickelt. Selbst leichte und mäßige Dysplasien bilden sich in den meisten Fällen ohne Therapie zurück (vgl. Tab. 2) [66]. Es erscheint demnach sinnvoll, den HPV-Test additiv zur konventionellen Zytologie im Primärscreening für Frauen ab 30 Jahren einzusetzen, da die Prävalenz der HPV-Infektionen ab diesem Alter sinkt und die Spezifität des HPV-Tests dadurch steigt. Dies empfiehlt auch die sich in Überarbeitung befindende S2-Leitlinie zur Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion durch die Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) [68]. Die fehlende Evidenz einer Inzidenz- und Mortalitätssenkung durch den Einsatz des HPV-Tests allein oder in Kombination mit der konventionellen Zytologie im gesetzlichen Primärscreening, sowie die Unklarheit über den Umgang mit Patientinnen deren HPV-Befund positiv die Zytologie jedoch unauffällig war, führte 2006 zu einer Ablehnung durch den Gemeinsamen Bundesausschuss (G-BA). Das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) veröffentlichte 2011 einen Bericht zur Nutzenbewertung des HPV-Tests im Primärscreening, welcher auf einen potentiell positiven Einfluss hinwies [61]. Ein Bericht aus den USA ermittelte anhand derselben Studiendaten einen Positive predictive value (PPV) von 10 %. Man würde demnach 9 von 10 untersuchten Frauen fälschlicherweise als krank erfassen [64]. Dies stellt eine psychische Belastung für die Patienten dar und würde eine Reihe kostenintensiver Untersuchungen nach sich ziehen, was den alleinigen Einsatz sehr unwahrscheinlich und eine Kombination mit der Zytologie auch weiterhin umstritten macht.

1.3 Etablierte optische Methoden der Diagnostik

1.3.1 Kolposkopie

Die Kolposkopie ist eine weltweit angewandte, nicht invasive optische Untersuchungsmethode zur Abklärung unklarer oder auffälliger zytologischer Befunde bei Verdacht auf eine zervikale Neoplasie. In den 20er Jahren wurde die Kolposkopie entwickelt und öffnete damit die Tür zu einer völlig neuen Art der gynäkologischen Diagnostik [69]. Die binokulare Betrachtung der Portio uteri, aber auch der Vagina und Vulva unter 6- bis 40-facher Lupenvergrößerung bei optimaler Beleuchtung vereinfachte die Früherkennung des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen, sowie die sichere Differenzierung der überwiegenden Mehrzahl an gutartigen Veränderungen des unteren Genitaltrakts. Im Jahr 2015 hat die Arbeitsgemeinschaft für Zervixpathologie und Kolposkopie (AG-CPC) unter Berücksichtigung der akutellen wissenschaftlichen Datenlage, der neuen Kolposkopienomenklatur (Rio 2011), sowie der neuen München III Klassifikation (2013) eine Handlungsempfehlung zur Diagnostik und Therapie von Erkrankungen des unteren Genitaltrakts herausgegeben. Die laut AG-CPC empfohlene Indikationsstellung zur Kolposkopie wird aus Tabelle 5 deutlich.

Klinische Situation	Empfehlung der AG-CPC
Primäres Screening zytologische Gruppe I	Keine Empfehlung zur Kolposkopie
Zytologische Gruppen III-p, III D, IVa, IVb, V	Kolposkopie je nach Anamnese (III-p), oder wenn Befundpersistenz nach zytologischer Kontrolle über 1 Jahr (III D ₁), bzw. 6 Monate (III D ₂), bei den übrigen Gruppen sofort
Zytologische Gruppe II-a und II-p	Kolposkopie nicht zwingend, nur bei auffälliger Anamnese, sowie je nach Alter und zytologischem Kontrollbefund Kolposkopie innerhalb von 1 oder 2 Jahren
R1 Resektion einer CIN	Kolposkopische Kontrolle innerhalb von 3 bis 6 Monaten nach Konisation, dann regelmäßige kolposkopische und zytologische Kontrollen für 2 Jahre
Zytologische Gruppe IVa-p während der Schwangerschaft	Kolposkopie (ggfs. Biopsie zw. 16.-20. SSW), bei CIN 3 kolposkopische und zytologische Kontrollen alle 3 Monate, Therapie post partum

Tab. 5: Indikation zur Kolposkopie laut Empfehlungen der AG-CPC (2015) [8, 70].

Durch die Kolposkopie kann anhand bestimmter morphologischer Oberflächenmerkmale auf Präkanzerosen, Karzinome oder gutartige Läsionen geschlossen werden. Dabei spielt die Übersehbarkeit der Transformationszone eine wichtige Rolle. Sie wird in den T-Zonentyp 1 (komplett kolposkopisch einsehbar), T-Zonentyp 2 (nach Spreizung des Zervikalkanals komplett einsehbar) und T-Zonentyp 3 (trotz Spreizung nicht einsehbar) eingeteilt [71].

Im Allgemeinen wird die Größe der Läsion, die Oberflächenstruktur, die Punktierung, das Mosaik, sowie die Gefäßdichte und deren Verlauf beurteilt. Bei der Oberflächenstruktur wird darauf geachtet, ob die Läsion im oder unterhalb des Oberflächenniveaus liegt, bzw. erhaben ist. Die Punktierung stellt das Durchsicherm von Blutgefäßen der Stromapapillen dar und wird durch deren Stauung zur „groben Punktierung“, während das Mosaik durch die parallel zur Basalmembran verlaufenden Blutgefäße dicht unterhalb des Epithels entsteht. Die Gefäße werden zusätzlich anhand ihrer Form beurteilt, so sind korkenzieherartige Gefäße, Kaliberschwankungen und Gefäßabbrüche als auffällig zu beurteilen. Durch die Applikation von Jod (Lugol'sche Probe/Schiller-Test) und 3-5 % Essigsäure erhält die Untersuchung einen dynamischen Charakter und liefert zusätzlich relevante Informationen. Durch das Jod färbt sich das gesunde, glykogenhaltige Plattenepithel der Ektozervix tief braun, während Zylinderepithel, unreifes Plattenepithel und Dysplasien weiß, also jodnegativ bleiben. Die Spezifität der braungefärbten Areale beträgt nahezu 100 %, während Jodnegativität nicht zwangsläufig auf einen krankhaften Prozess hindeutet [8, 9].

Die Essigreaktion bewirkt hingegen eine Weißfärbung dysplastischer und metaplastischer Areale. Die Reaktion konnte noch nicht vollständig wissenschaftlich erklärt werden, beruht jedoch vermutlich auf der Interaktion der Essigsäure mit den Kernproteinen sowie einer zellulären Dehydratation. In dysplastischen Zellen ist die Kernaktivität und damit auch der Proteingehalt höher, wodurch die Reaktion mit der Essigsäure in diesen Arealen, mit zunehmendem Dysplasiegrad intensiver ausfällt. Die Weißfärbung lässt sich durch eine erhöhte Rückstreuung des Lichts, welche zu einer Verminderung der Transparenz führt, erklären. In den übrigen Arealen wird das Licht aufgrund der geringeren Kerndichte absorbiert und die Reaktion bleibt aus. Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung des Dysplasiegrads ist die Geschwindigkeit mit der die Reaktion einsetzt und abklingt. So setzt die Weißfärbung bei hohem Dysplasiegrad rasch und intensiv ein während sie jedoch nur langsam wieder abklingt. Es handelt sich somit um ein reversibles Phänomen [72-74].

Anhand der genannten Kriterien werden die Läsionen unter anderem in „minor changes“ und „major changes“ eingeteilt. Die aktuell gültige, 2011 durch die International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC) erstellte Nomenklatur ist in Tabelle 6 dargestellt.

Abnorme Befunde	Grad 1 (minor changes)	Zartes essigweißes Epithel, zartes Mosaik, zarte Punktierung
	Grad 2 (major Changes)	Intensiv essigweißes Epithel, grobes Mosaik, grobe Punktierung, prominente Drüsenausführungsgänge, scharfe Grenzen, „inner border sign“, „ridge sign“, rasche Essigsäurewirkung
	Unspezifisch	Leukoplakie (Keratose, Hyperkeratose), Erosion, Lugol'sche Probe (Schiller-Test)
Verdacht auf Invasion	Atypische Gefäße, Kontaktblutungen, unregelmäßige Oberfläche, exophytische Läsion, Nekrose, Ulkus, Tumor	

Tab. 6: Ausschnitt aus der kolposkopischen Nomenklatur der Cervix uteri. IFCPC (2011) [75].

Die Übereinstimmungsrate kolposkopischer Befunde bei unterschiedlichen Untersuchern beträgt zwischen 30% und bis über 95%. Die Kappa-Werte (Cohen's Kappa als Maß der Übereinstimmung) liegen zwischen $\kappa=0,4$ (geringe Übereinstimmung) bis $\kappa=0,6$ (mäßige Übereinstimmung) [76-83]. Gründe für niedrige Übereinstimmungsraten und Kappa-Werte sind das Vorliegen kleiner Läsionen (< 10 mm), nicht klar abgrenzbare Befunde, sowie die geringe kolposkopische Erfahrung mancher Untersucher [84]. Mit zunehmender Erfahrung der Untersucher verbessert sich deren Übereinstimmungsrate auf über 90% [76]. In „receiver operating characteristic“ (ROC)- Analysen weist die Kolposkopie in der Abgrenzung leichter von hochgradigen Dysplasien bzw. von Karzinomen eine „area under the curve“ (AUC) von 0,80 bis 0,87 auf und hat damit eine mit anderen hocheffizienten diagnostischen Verfahren vergleichbare Testgüte [85-87]. Die Unterscheidung zwischen gesundem Epithel und einer leichten Dysplasie besitzt mit einer AUC von 0,77 eine leicht niedrigere Testgüte [9]. Die Korrelation zwischen der Kolposkopie und Histologie ist mit einem $p < 0,0001$ hochsignifikant und besitzt einen Übereinstimmungsgrad von 77% [88]. Durch die Biopsieentnahme unter kolposkopischer Sicht werden zwei Drittel aller kolposkopisch

vermuteten CIN III entdeckt. Ebenfalls von Vorteil ist die Abstrichentnahme unter kolposkopischer Sicht, da sie die Exaktheit der zytologischen Diagnostik verbessert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kolposkopie ein wertvolles Instrument zur Diagnostik der zervikalen Dysplasien und des Zervixkarzinoms ist, welches sowohl in der gynäkologischen Vorsorge- und Kontrolluntersuchung als auch intraoperativ häufig zum Einsatz kommt [8].

1.3.2 Histopathologie

Die feingewebliche Untersuchung repräsentiert neben der Kolposkopie und der Zytologie einen der drei diagnostischen Pfeiler sowohl des prä- als auch des postoperativen Managements und der Kontrolle. Differenzialdiagnostisch stellen die kolposkopiegesteuerte Knips- oder Stanzbiopsie bei suspekten Bezirken im Bereich der Ektozervix, sowie die endozervikale Kürettage (ECC) im Falle einer kolposkopisch nicht oder nur schlecht einsehbaren, endozervikal gelegenen Läsion, und die histopathologische Aufarbeitung des gewonnenen Gewebes den Goldstandard bei Verdacht auf eine CIN dar [19]. Eine ebenfalls wichtige Rolle spielt die histopathologische Aufarbeitung von Konisationspräparaten. Diese Art von Eingriff wird vor allem zum Therapiezweck, aber auch unter diagnostischem Aspekt meist als elektrochirurgische Loop Exzision (LEEP) durchgeführt [89]. Durch Entfernung der gesamten Transformationszone, in welcher sich der Hauptteil der Läsionen befindet (lediglich 3 % sind rein ektozervikal und 10 % endozervikal lokalisiert), kann gegenüber einer gezielt punktuell entnommenen Biopsie ein besserer Überblick über die pathologischen Prozesse an der Zervix gewonnen werden [11]. Die Präparate werden standardmäßig mit Hämatoxylin und Eosin (H.E Färbung) angefärbt und unter einem Lichtmikroskop beurteilt (Abb. 7).

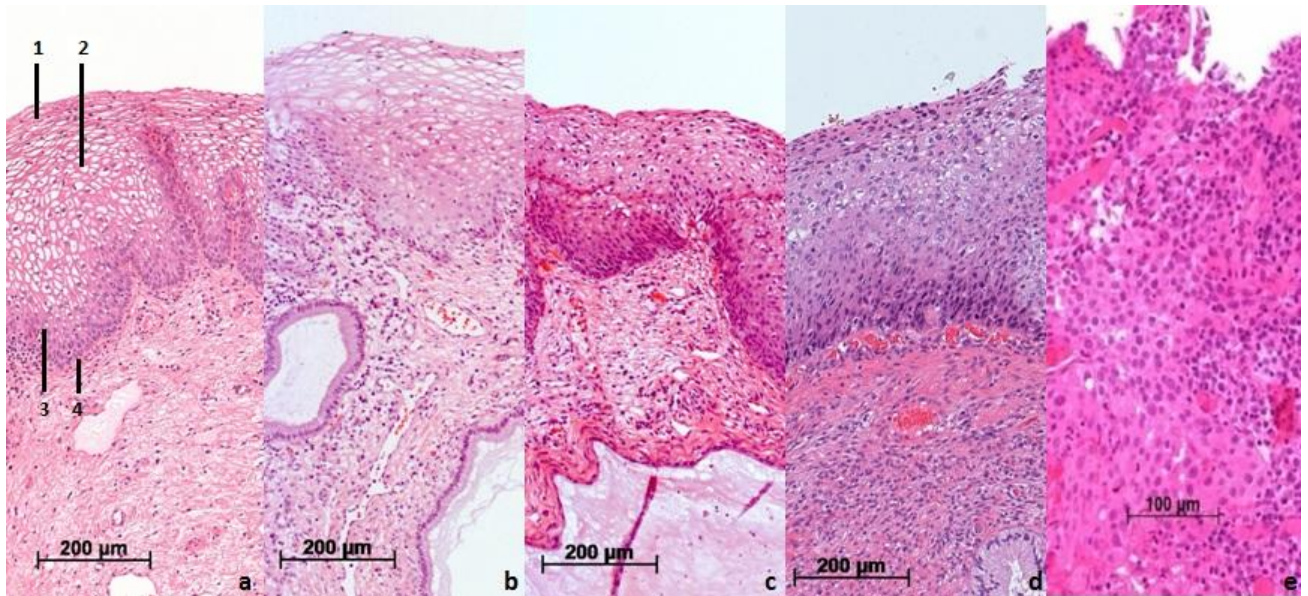


Abb. 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Konisationspräparaten aus dem eigenen Institut in H.E Färbung. a) normales mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel bestehend aus der Superfizialzellschicht (1), Intermediärzellschicht (2), Parabasalzellschicht (3) und Basalzellschicht (4), sowie b) CIN 1, c) CIN 2, d) CIN 3 und e) invasives Plattenepithelkarzinom. Die Basalzellschicht ist in a-d gut sichtbar, während sie in e durchbrochen wurde.

Bei Schwierigkeiten in der Differenzierung zwischen den kontinuierlich ineinander übergehenden CIN Graden, sowie der Unterscheidung eines pathologischen von einem nicht-pathologischen Befund, kann die Anwendung der Immunhistochemie hilfreich sein. Der cyclinabhängige Kinaseinhibitor p16 spielt in der Regulation des Zellzyklus eine Rolle und wird entsprechend des Schweregrads der CIN unterschiedlich stark in den betroffenen Arealen exprimiert (Abb. 8). In einer Metaanalyse zeigten 82% der CIN 3, 68% der CIN 2 und 38% der CIN 1 Befunde eine Überexpression des Proteins. Lediglich 2% der Normalbefunde wiesen ebenfalls eine Überexpression auf [90].

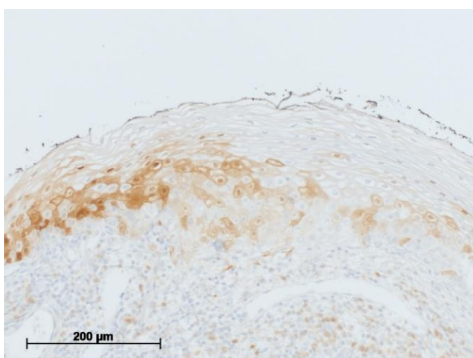


Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Konisationspräparats aus dem eigenen Institut. Immunhistochemischer Nachweis einer CIN 1 durch zytoplasmatische und nukleäre p16 Positivität im basalen Epithelabschnitt.

1.4 Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist eine nicht invasive optische Untersuchungsmethode, die sich des Prinzips der Interferometrie bedient. Durch diese Methode werden, ähnlich dem B-Scan der Sonographie, zweidimensionale Schnittbilder des untersuchten Gewebes generiert [91]. Im Unterschied zur Sonographie werden in der OCT jedoch Licht- anstatt Schallwellen verwendet [92]. Eine Superlumineszenzdiode (SLD) generiert niedrigkohärentes ($10\text{ }\mu\text{m}$), breitbandiges Licht im nahen Infrarotbereich (NIR, 1300nm), welches durch einen Strahlteiler in zwei Fraktionen aufgeteilt wird. Eines der beiden Lichtbündel wird dabei an einem Referenzspiegel, der sich in bekanntem, aber mechanisch variierbarem Abstand zum Strahlteiler befindet, reflektiert. Dieser Referenzarm dient im Time-Domain-Modell (TD-Modell) der Ermittlung der genauen Lokalisation des reflektierten Lichtstrahls. Das zweite Lichtbündel, der sog. Messarm, dringt senkrecht in das zu untersuchende Gewebe ein und wird dort an verschiedenen Strukturen ebenfalls reflektiert. Letztendlich werden sowohl der Referenzarm als auch der Messarm in einem Photodetektor (Michelson Interferometer) zusammengeführt, wo die Laufzeit- und Intensitätsunterschiede der interferierenden Signale analysiert werden [93]. Eine vereinfachte schematische Darstellung des technischen Prinzips liefert Abbildung 9.

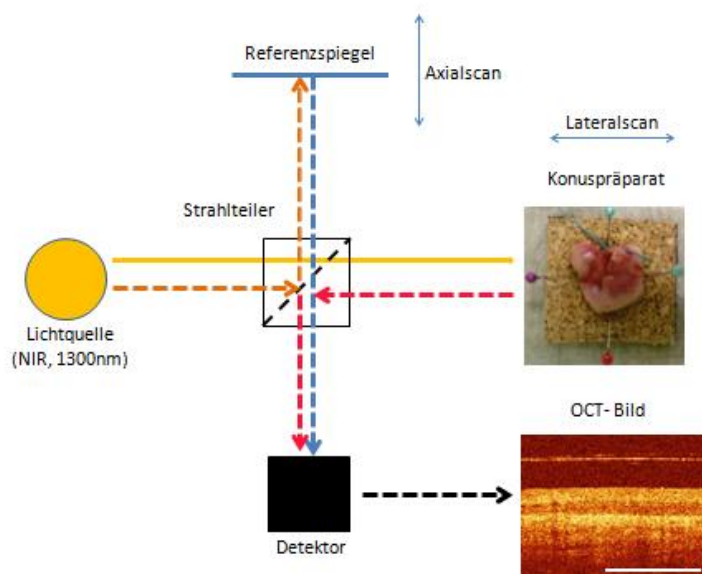


Abb. 9: Vereinfachte schematische Darstellung des technischen Prinzips der Time-Domain-OCT (TD-OCT) modifiziert nach Gallwas et al., (Ultrasound Obstet Gynecol. 2010 Nov; 36(5), S.625, Fig. 1) [94].

Es tragen lediglich diejenigen reflektierten Lichtstrahlen, die miteinander interferieren zur Bildentstehung bei [95]. Elektronische Detektionssysteme wie die des Ultraschalls erlauben wegen der vergleichsweise langsamen Ausbreitung der Schallwellen eine Detektion anhand der Laufzeitunterschiede der Wellen. Wegen der hohen Lichtgeschwindigkeit (3×10^8 m/sec) kann man beim OCT nicht auf Laufzeitunterschiede zurückgreifen und muss stattdessen das Prinzip der Interferenz anwenden. Interferenz bedeutet, dass sich zwei oder mehrere Lichtwellen mit einer festen Phasenbeziehung überlagern. Eine feste Phasenbeziehung ist dadurch definiert, dass die Unterschiede zwischen denselben Schwingungszuständen über einen gewissen zeitlichen und räumlichen Bereich hinweg gleichbleiben. Besitzt das Licht eine große Kohärenzlänge, so ist der Bereich in dem eine feste Phasenbeziehung besteht ebenfalls sehr groß, während er bei niedrigkohärentem Licht klein ist. Das in der OCT verwendete Licht besitzt eine kurze Kohärenzlänge. Der maximale Laufzeitunterschied zwischen den reflektierten Lichtstrahlen aus dem Referenz- sowie dem Messarm, der bei deren Überlagerung noch zu einem zeitlich und räumlich stabilen Interferenzmuster führt ist daher kurz. Das dadurch zustande kommende Interferenzmuster ermöglicht eine hohe Feinauflösung des Bilds. Durch das OCT-Gerät wird simultan in zwei Ebenen gescannt, wodurch ein zweidimensionales Bild zustande kommt. Der Lichtstrahl wird in der Sonde transversal zur Oberfläche bewegt (Lateralscan) während durch die mechanische Verschiebung des Referenzspiegels longitudinal zum Gewebe gescannt wird (Axialscan). Die Information wird im Interferometer verarbeitet und eine zweidimensionale Tomographie errechnet, welche dann auf dem Bildschirm in logarithmischen Graustufen oder als intensitätsabhängiges Falschfarbenbild dargestellt wird. Sowohl die Entfernung, als auch die Intensität des reflektierten Lichtstrahls können in einer im Mikrometerbereich liegenden Auflösung ermittelt werden. Bei der OCT ist im Unterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie und der konfokalen Mikroskopie die transversale Auflösung von der longitudinalen entkoppelt. Die numerische Apertur der verwendeten Optik ist dabei für die transversale Auflösung ausschlaggebend, während die longitudinale Auflösung von der Kohärenzlänge abhängt und invers proportional zur Bandbreite der verwendeten Lichtquelle ist [96]. Herkömmliche OCT-Geräte mit einer SLD als Lichtquelle besitzen somit eine Auflösung von 10-15 μm , während durch neuere ultrahigh-resolution-OCTs eine longitudinale Auflösung von 2-3 μm erzielt werden konnte [97]. Neueste Laserlichtquellen ermöglichen heutzutage eine Auflösung von bis zu 1 μm . Die Eindringtiefe der OCT ist in nicht transparentem Gewebe durch die Dämpfung, Absorption sowie der Lichtstreuung limitiert und beträgt in den meisten Geweben 2-3 mm. Damit ist sie derjenigen des Ultraschalls

unterlegen, wohingegen die axiale und laterale Auflösung mit 1-15 μm 10- bis 100-mal höher ist und damit eine nahezu histologische Auflösung auf zellulärer und subzellulärer Ebene ermöglicht [96]. 1991 wurde die OCT durch die Arbeitsgruppe um James G. Fujimoto am Massachusetts Institute of Technology (MIT) erstmals als bildgebendes Verfahren an einer humanen Retina und Koronararterie ex vivo beschrieben [98]. Die OCT-Technik wurde 1996 zum kommerziellen Einsatz in der ophthalmologischen Diagnostik freigegeben und erhielt 2002 die Zulassung durch die FDA. Seither stellt sie ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik retinaler Erkrankungen und des Glaukoms in der Augenheilkunde dar [99]. Etwas schwieriger gestaltete sich die Anwendung der OCT in medizinischen Bereichen mit nicht transparentem Gewebe, wodurch die Augenheilkunde bis heute das einzige Fachgebiet darstellt, in welchem sich die OCT klinisch etabliert hat. Es besteht jedoch auch in vielen anderen Fachgebieten ein hohes Forschungsinteresse, was stark zur Weiterentwicklung und Verbesserung der OCT-Geräte beigetragen hat. Die Kopplung der OCT mit Kathetern, Endoskopen sowie Laparoskopern ermöglichte einen vielseitigeren Einsatz in den Bereichen der Kardio- und Angiologie, sowie in der onkologischen Dermatologie, Gastroenterologie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Urologie sowie in der Gynäkologie [96, 99]. Zusätzlich zu dem oben beschriebenen TD-Modell gibt es nun neuere OCT-Geräte, welche nach dem Frequency-Domain-Modell (FD-Modell) arbeiten. Im Unterschied zum TD-Modell kommt hier das Interferenzmuster nicht durch die mechanische Spiegelverschiebung im Referenzarm, sondern durch die rasche Alternation der Wellenlänge des aus der Laserquelle ausgesendeten Lichts zustande. Der Tiefenscan wird dann durch die inverse Fourier-Transformation errechnet. Man unterscheidet beim FD-Modell zwischen der räumlichen (Fourier-Domain-OCT) sowie der zeitlichen (Swept-Source-OCT) Verschlüsselung der spektralen Information. Der Ersatz der mechanischen Spiegelverschiebung durch die deutlich schneller durchführbare Wellenlängenänderung des Lichts ist von Vorteil, da dadurch schnellere Scanraten sowie dreidimensionale Aufnahmen ermöglicht werden [92].

1.4.1 Anwendung der OCT in der Gynäkologie

Die Anwendung der OCT in der onkologischen Gynäkologie ist von großem wissenschaftlichem Interesse und könnte in Zukunft zu einer Verbesserung sowohl der Krebsfrüherkennung, als auch der intra- oder postoperativen Diagnostik und Therapie führen. Studien haben gezeigt, dass die OCT zur intraoperativen Untersuchung von Lymphknoten bei primärem Mamma Karzinom, sowie bei der Steuerung von Brustbiopsien hilfreich ist [100, 101]. Die Früherkennung und Diagnostik des Zervixkarzinoms sowie zervikaler

intraepithelialer Neoplasien mittels OCT hat in der aktuellen Forschung ebenfalls einen hohen Stellenwert. 1997 wurden durch Sergeev et al. erste in vivo Untersuchungen verschiedener menschlicher Schleimhäute, unter anderem des Zervixepithels, durchgeführt und die Befunde erstmals beschrieben [102]. 1999 führten Pitris et al. eine Studie sowohl an zervikalem als auch an uterinem Gewebe in vitro durch. Die Strukturen einer gesunden Ekto- bzw. Endozervix, wie beispielsweise das Epithel, die Basalmembran, das Stroma und Drüsen, konnten dargestellt und zuverlässig reproduziert werden. Der Vergleich zwischen den OCT Befunden aus gesundem Zervix- und Uterusgewebe mit dem Gewebe aus in situ Karzinomen, sowie invasiven Zervix- und Endometriumkarzinomen zeigte deutliche Unterschiede [103]. 2004 wurden durch Escobar et al. in einer in vivo Studie an 50 Patientinnen diagnostische Kriterien zur Beurteilung von Zervix- und Vulvagewebe mittels OCT erstellt. Dabei wurden gesunde sowie pathologische Läsionen mittels OCT erfasst und mit der Histologie der aus denselben Stellen entnommenen Biopsien verglichen [104]. Diese Kriterien wurden durch mehrere Studien von Gallwas et al. weiter präzisiert und stellen die Grundlage dieser Arbeit dar. In einer ersten Studie wurde die Durchführbarkeit der OCT im Rahmen der Dysplasiesprechstunde untersucht, was sich als unkompliziert erwies [105]. Ziel der darauffolgenden Studie war die Überprüfung und Ergänzung der zu dem Zeitpunkt geltenden Kriterien zur Differenzierung zwischen normalem Gewebe, Entzündung, Dysplasie sowie invasivem Zervixkarzinom. Folgende Strukturen bzw. Veränderungen wurden als zusätzliche Kriterien zur bildmorphologischen Interpretation in der Studie durch Gallwas et al. definiert: Gesundes Gewebe zeigt eine klar definierte Dreischichtung (Abb. 10). Auf die stärker rückstreuende obere, folgt eine schwächer rückstreuende mittlere Epithelschicht und dann, durch eine starke Signalzunahme scharf abgegrenzt, das Stroma. Die scharfe Grenze zwischen Epithel und Stroma entspricht der Basalmembran, die optisch selbst nicht dargestellt werden kann, da sie zu dünn ist.

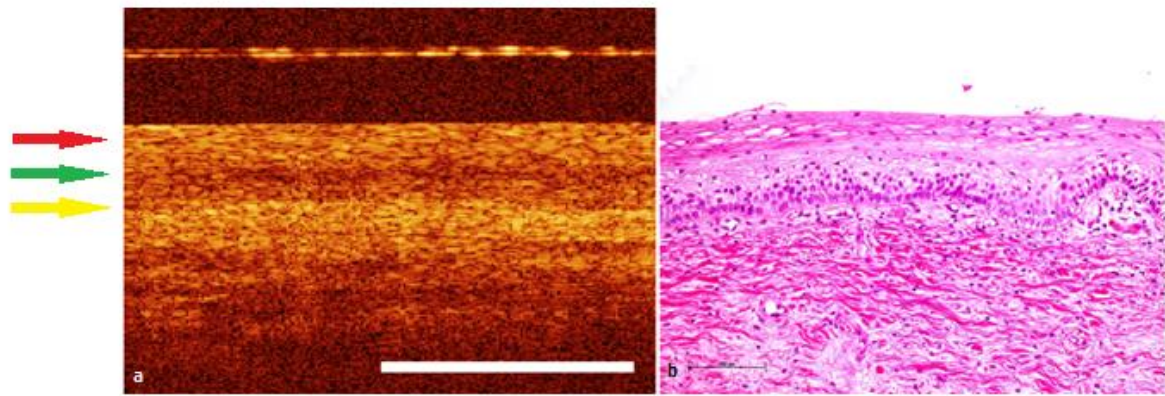


Abb. 10: Darstellung von gesundem zervikalem Plattenepithel mittels OCT (a) und entsprechender Histologie (b). Roter Pfeil: Superfizialzellschicht, grüner Pfeil: Intermediär-und Parabasalzellschicht, gelber Pfeil: Epithel/Stroma-Grenze, indirekt die Basalmembran. OCT-Bild sowie Histologie aus dem eigenem Studienkollektiv. Der weiße Balken im OCT-Bild dient als Maßstab und entspricht 1 mm.

In entzündetem Gewebe verwischt, bei erhaltener Schichtung, die scharfe Abgrenzung durch die Basalmembran aufgrund der ödematösen Schwellung und es zeigt sich in vielen Fällen auch eine verstärkte Rückstreuung der oberen Epithelschicht und eine schlagartige Signalabschwächung der sich darunter befindenden Gewebestrukturen. Bei den zervikalen Dysplasien hingegen beobachtet man Unregelmäßigkeiten in der Epithelschichtung bis hin zur totalen Aufhebung und Homogenisierung des Gewebes wie im Falle eines Karzinoms. Bei einer CIN 1 lässt sich die Dreischichtung noch deutlich erkennen, wobei die Übergänge zwischen oberer und mittlerer Schicht, sowie zwischen mittlerer Schicht und Stroma im Vergleich zu einem Normalbefund undeutlicher sind. Die CIN 2 sowie die CIN 3 sind in der OCT Diagnostik durch einen zunehmenden Schichtungsverlust und durch den optischen Eindruck des säulenartigen Hervordrängens des Stromas Richtung Oberfläche charakterisiert. Durch den erhöhten Streukoeffizienten der dysplastischen gegenüber den normalen Zellen wird der Kontrast zwischen Epithel und Stroma verringert bis hin zum völligen Verschwinden der Schichtung. Dieses Phänomen ist mit zunehmendem Dysplasiegrad auch stärker ausgeprägt. In der zuletzt genannten Studie ergab die Unterscheidung von Dysplasien und Karzinomen gegenüber normalem Gewebe eine hohe Sensitivität von 95-96%, bei einer eher niedrigen Spezifität von 29-45% und einer sehr guten Untersucherübereinstimmung mit einem $\kappa=0,68$ [94]. Eine weitere Studie, welche die genaue Differenzierung der einzelnen CIN Grade zum Ziel hatte zeigte eine exakte Übereinstimmung mit der Histologie in 57-68% der Fälle, mit den schlechtesten Ergebnissen für die CIN 1. Die Kombination zweier CIN Grade (CIN2 + CIN 3) erwies sich als vorteilhaft, da die Übereinstimmung dann bis zu 85%

betrug [106]. Im Jahre 2003 wurden in einem Artikel von Drezek et al. zahlreiche neue Methoden zur Diagnostik von Neoplasien der Zervix, unter anderem auch die OCT, beschrieben. Dabei wurden die limitierte Eindringtiefe, der Kontrast, sowie das begrenzte Untersuchungsfeld als Nachteile dieser Methode diskutiert. Zur Verbesserung der Diagnostik verschiedener Dysplasiegrade durch die OCT wurden neue hochauflösendere Geräte (ultrahigh-resolution-OCT mit Ti:Al₂O₃ Laser als Lichtquelle) sowie Kontrastmittel erwähnt [107]. In mehreren Studien wurden neue Ansätze zur quantitativen Auswertung von OCT Bildern getestet mit dem Ziel zusätzlich zur subjektiven bildmorphologischen Beurteilung objektive Kriterien der Diagnostik zu liefern. Einen solchen Ansatz stellen die Helligkeits- bzw. Intensitätsmessungen des Epithels dar, die 2005 durch Zuluaga et al. sowie 2013 durch Belinson et al. untersucht wurden. In beiden Studien wurden signifikante Unterschiede in der Intensität der Rückstrahlung zwischen normalem und dysplastischem zervikalem Epithel, sowie zwischen den verschiedenen CIN Graden, dem Karzinom und der Plattenepithelmetaplasie beobachtet [108, 109]. In einer 2011 publizierten Studie von Gallwas et. al. wurden Intensitätsprofile der OCT Bilder erstellt und die Kurven je nach Befundklasse zusammengefasst und gemittelt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Profile der Gruppen Normalbefund, CIN 1 und Karzinom unterscheiden, während eine Abgrenzung der übrigen Gruppen eher schwierig ist [110]. Die OCT besitzt als nicht invasive Methode großes Potential in der gynäkologischen Diagnostik, da sie auf unkomplizierte Weise dem Untersucher quasi eine optische Biopsie aus verdächtigen Gewebebereichen liefert. In Zukunft könnte die OCT als diagnostisches Verfahren, ergänzend zur Kolposkopie und VIA (visual inspection with acetic acid), in der Krebsfrüherkennung eingesetzt werden. Einen hohen Stellenwert könnte die OCT zukünftig in Entwicklungsländern erlangen. Dort wären, aufgrund der geringen Ressourcen, kostengünstige Verfahren, die zudem noch risikofrei und in Echtzeit durchgeführt werden können, in der Frühdiagnostik des Zervixkarzinoms von großem Vorteil [111].

1.4.2 Optisches Clearing

Im klinischen Alltag bieten nichtinvasive diagnostische Methoden wie die OCT, deren technisches Prinzip von den optischen Eigenschaften des zu untersuchenden Gewebes abhängig ist, durch ihr geringes Risiko, den niedrigen Kosten, sowie der schnellen Durchführbarkeit zahlreiche Vorteile gegenüber anderen bildgebenden Verfahren wie der Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT). Dennoch sind diese Untersuchungsverfahren durch die geringe Eindringtiefe des Lichts in biologischem Gewebe

limitiert. Biologisches Gewebe stellt ein optisch inhomogenes und lichtabsorbierendes Medium dar und einfallende Lichtstrahlen werden aufgrund der Streuung und Absorption je nach Gewebebeschaffenheit defokussiert und abgeschwächt [112]. Die beste Lichtpenetration in biologischem Gewebe konnte bei Wellenlängen zwischen 700 und 1400 nm beobachtet werden. Die Eindringtiefe der OCT (NIR, 1300 nm) wird somit vorwiegend durch die Mehrfachstreuung im Gewebe limitiert [113]. In Konsequenz daraus muss versucht werden die ungerichtete Mehrfachstreuung im Gewebe zu vermindern. Da die OCT jedoch auf die Interferenz des am untersuchten Gewebe reflektierten Lichtstrahls mit dem Lichtstrahl aus dem Referenzarm basiert muss gleichzeitig versucht werden die dafür benötigte gerichtete Rückstreuung aus dem Gewebe zu erhalten. Ein Ansatz besteht in der lokalen Anwendung hyperosmotischer, biokompatibler Agenzien, welche, wie durch Tuchin et al. postuliert, zu einer optischen Lichtung (tissue optical clearing, TOC) des zu untersuchenden Gewebes führen [114, 115]. Es konnte beobachtet werden, dass die Bildauflösung mit zunehmender Eindringtiefe nahezu exponentiell abnimmt. Die Anwendung von optical clearing agents (OCAs) könnte dazu beitragen eine gute Bildauflösung selbst in der Tiefe von streuendem Gewebe zu bewahren [116]. Die Mechanismen des TOC sind multipel und sind bis heute nicht vollständig geklärt, was sie zum Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Forschung macht. Der Hauptmechanismus besteht wahrscheinlich darin, dass die OCA (Brechungsindizes 1.40-1.47) zu einer Anpassung des Brechungsindex‘ der stärker streuenden Gewebepartikeln wie Zellen und Kollagen sowie dem umliegenden Medium (Interstitielle Flüssigkeit und Zytoplasma) führen. Zusätzlich kommt es durch die osmotischen Eigenschaften der verwendeten Agenzien zur Dehydratation, wodurch die streuenden Gewebestrukturen dichter zusammengepackt und geordnet werden [117]. Dimethylsulfoxid (DMSO) z.B. zeigt eine schnelle (first-stage) Diffusion in den Interzellularraum mit einer Dehydratation und Brechungsindexanpassung die zu einer Kontrast- und Tiefenzunahme führt. Die (second-stage) Diffusion ins Zellinnere hingegen bewirkt eine nur geringe Dehydratation und verbessert vorwiegend die Eindringtiefe. Insgesamt verringerte DMSO in Studien die Lichtabsorption und verbesserte die Transmission um das Dreifache [112, 118, 119]. In vitro Versuche zeigten, dass die molekulare Struktur der OCA ebenfalls eine große Rolle für das optical clearing Potential (OCP) spielt. Dabei lassen sich folgende Untergruppen unterscheiden: Alkohole (Glycerol, Polyethylenglycol (PEG)), Zucker (Mannitol, Glucose, Dextrose), organische Säuren (Essigsäure, Ameisensäure) sowie organische Lösungsmittel (DMSO) [117]. Eine Studie von Choi et al. hat gezeigt, dass OCP nicht vom Brechungsindex und der Osmolalität (Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen in einer Lösung pro 1 Kg

Lösungsmittel) der verwendeten Substanz abhängen, sondern eher mit der Anzahl der Hydroxylgruppen zusammenhängen könnte [120]. Dies bestätigte eine Studie von Mao et al., welche die Lichtdurchlässigkeit in Schweinehaut nach Applikation von OCA aus der Alkoholgruppe beobachtete. Der stärkste Effekt ergab sich für das Triol Glycerol, gefolgt von den Diolen (z.B. PEG) mit einem moderaten Effekt. Die Lichtdurchlässigkeit nahm schon nach wenigen Minuten zu und betrug nach 60-minütiger Applikation von Glycerol das zweifache und bei PEG 400 das 1,7-fache der Initialintensität. Der schwächste Effekt ergab sich bei den Substanzen mit lediglich einer Hydroxylgruppe. Dies zeigte, dass Substanzen mit einer hohen Anzahl an Hydroxylgruppen hydrophile Barrieren, wie beispielsweise die Epidermis, leichter passieren um an ihren Wirkort gelangen zu können. Die Molekülgröße könnte dabei ebenfalls eine Rolle spielen, ergab jedoch für die untersuchten Größen von 75-400 Da keine signifikanten Unterschiede [121]. Als ein weiterer Clearingmechanismus wurde die Dissoziation der Kollagenfibrillen beschrieben. Diese stellen innerhalb der verschiedenen Gewebe die Hauptbrechungszentren des Lichts dar, was Untersuchungen am menschlichen Auge sowie an der Dermis ergaben. Die nicht kovalenten Wasserstoffbrückenbindungen, welche bekanntermaßen zwischen den Tripelhelices des Kollagens bestehen, werden durch die stark elektronegativen Hydroxylgruppen der OCA destabilisiert und führen somit zu einer erhöhten Transparenz. Dies ist durch das Hinzufügen von phosphatgepufferten Salzlösungen reversibel [117]. Die dynamischen Vorgänge, welche letztendlich zum gewünschten Effekt führen, unterscheiden sich je nach Agens und verhalten sich in vivo anders als in vitro. Für ein effektives Clearing müssen jedoch alle Agenzien imstande sein, sowohl die oberflächlichen Barrieren, wie beispielsweise das Stratum Corneum der Haut, zu überwinden, als auch die Zellmembranen zu passieren. Viele der Untersuchungen mit OCA wurden an tierischer sowie menschlicher Haut ex vivo durchgeführt, wodurch man sich mit der Problematik der Diffusionsbarriere intensiv beschäftigte. Eine Verbesserte Penetration des Agens durch das Gewebe konnte durch chemische Trägerstoffe, sog. Penetrationenhancern, wie beispielsweise Thiazon, 1,2-Propanediol oder DMSO erzielt werden [112, 118, 122].

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die OCT hat sich in den letzten 20 Jahren und in der aktuellen Forschung als vielversprechende optische Methode zur Verbesserung der Diagnostik für die Früherkennung sowohl des Zervixkarzinoms als auch der nichtinvasiven Vorstufen erwiesen. Aufgrund der beschränkten Ressourcen, sowie der hohen Inzidenzrate des Zervixkarzinoms würden die Entwicklungsländer besonders von dem Einsatz dieser günstigen, risikofrei und schnell durchführbaren aber effektiven Methode profitieren. Auch der Einsatz im Rahmen der Krebsvorsorgeuntersuchung in den westlichen Ländern könnte die Diagnostik erleichtern und verbessern. Die unter Kolposkopie erfolgte Biopsieentnahme bedarf einer großen Erfahrung seitens des Untersuchers um eine Läsion überhaupt und auch deren Punctum Maximum richtig zu lokalisieren. Hier könnte der additive Einsatz der OCT die Sensitivität verbessern. Intraoperativ wäre der Einsatz zur Darstellung der Resektionsränder ebenfalls denkbar. Fortschritte sind einerseits in der technischen Weiterentwicklung der OCT-Geräte zu erwarten, andererseits könnten unter den derzeitigen Voraussetzungen optische Clearingmittel die Bildqualität und somit die Diagnostik verbessern.

In der vorliegenden prospektiven, klinisch experimentellen Arbeit sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Hat die Anwendung von Essigsäure/DMSO/PEG einen signifikanten Einfluss auf die Übereinstimmungsrate zwischen OCT und histopathologischem Befund zur Folge?
- Zeigt die Anwendung von Essigsäure, bzw. den optischen Clearingmitteln DMSO/PEG eine Auswirkung auf die Bildqualität der OCT?
In welchem Maße werden Helligkeit, Kontrast und Tiefe beeinflusst?
- Inwieweit können diese Auswirkungen durch den Untersucher subjektiv wahrgenommen werden?
- Inwieweit lassen sich diese Auswirkungen auch objektiv, beispielsweise mittels Helligkeitsmessungen mit Hilfe von Helligkeitsprofilen quantifizieren?
- Welche Unterschiede bestehen zwischen den verwendeten Clearingmitteln?

3. Material und Methoden

Diese Arbeit wurde als unizentrische, prospektive klinische Studie konzipiert und am Campus Großhadern des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die teilnehmenden Patientinnen wurden vorab über die Studie aufgeklärt und deren Einwilligung zum Vorgehen schriftlich in Form eines Aufklärungsbogens dokumentiert. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

3.1 Patientenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurden frische Konuspräparate, welche im Rahmen von Schlingenkonisationen (LEEP, loop electrosurgical excision procedure) gewonnen wurden, verwendet. Die Patientinnen wurden im Zuge der wöchentlichen Dysplasiesprechstunde am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München rekrutiert. Bis auf die Volljährigkeit gab es bezüglich des Alters keine Einschränkungen für die Teilnahme an der Studie. Es war ebenfalls nicht von Bedeutung ob die Patientinnen sich in einem prä- oder postmenopausalen Stadium befanden, schwangere Patientinnen wurden allerdings von der Studie ausgenommen. Die Indikation zur Konisation stellte sich in fast allen vorliegenden Fällen aufgrund einer histologisch gesicherten CIN 3. Bei den Präparaten der in die Studie eingeschlossenen Patientinnen handelte es sich bis auf ein Präparat immer um Gewebe aus Erstkonisationen. Das eine aus einer Rekonisation gewonnene Präparat war trotz der Voroperation gut zu untersuchen und wurde aus diesem Grund in die Studie mit einbezogen.

Alle in diese Studie eingeschlossenen Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Studiendurchführung bereits volljährig, sowie aufklärungs- und einwilligungsfähig.

3.2 Technische Daten zum verwendeten OCT-Gerät.

Die Studie wurde mit einem Niris® Imaging System (Imalux Corporation, Cleveland, OH, USA) durchgeführt. Es handelt sich bei dem Gerät um ein TD-OCT, welches seine Bilder durch mechanische Verschiebung des Referenzspiegels generiert. Als Lichtquelle dient eine Superlumineszenzdiode, durch welche niedrigkohärentes, breitbandiges Licht im NIR, 1300 nm erzeugt wird. Die 2 m lange wiederverwendbare Sonde hat einen Durchmesser von 2,7 mm und beherbergt in ihrem elastischen Schutzkabel das optische System (Abb. 11). Weiterhin besteht das Gerät aus einem Monitor mit Tastatur, auf dem die Bilder betrachtet, sowie beschriftet und abgespeichert werden können und einem Pedal zur Bedienung des Geräts während der Untersuchung. Durch Drücken des Pedals kommt es zur Bildaufnahme. Laut Herstellerangaben, beträgt der maximal mögliche Abstand zwischen der Sonde und dem zu untersuchenden Gewebe 0 bis 0,5 mm, es muss folglich ein direkter Kontakt zum Gewebe hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde eine sterile, halbstarre Einmalschutzhülle zur Anwendung über der Sonde entwickelt (Niris® Probe Sheath, Imalux Corporation, Cleveland, Oh, USA). Die Messtiefe durch das eindringende Licht beträgt, abhängig von der Beschaffenheit des Gewebes, bis zu 1,5 mm, die laterale Scanbreite 1,6 bis 2,4 mm. Die laterale Auflösung des Geräts liegt bei $\leq 50 \mu\text{m}$, während in der Tiefe eine Auflösung zwischen 10-20 μm erzielt wird. Durch das System kann bei einer Bildfrequenz von 0,66 Hz und einer Aufnahmegeschwindigkeit von ca. 1,5 s pro Bild das untersuchte Gewebe in Echtzeit erfasst werden. Die Darstellung erfolgt mit 200x200 Pixeln in verschiedenen logarithmischen Farbstufen. Das Niris® Imaging System erhielt 2006 eine Zulassung durch die FDA, sowie 2006 das CE- Kennzeichen durch die Europäische Union (EU).

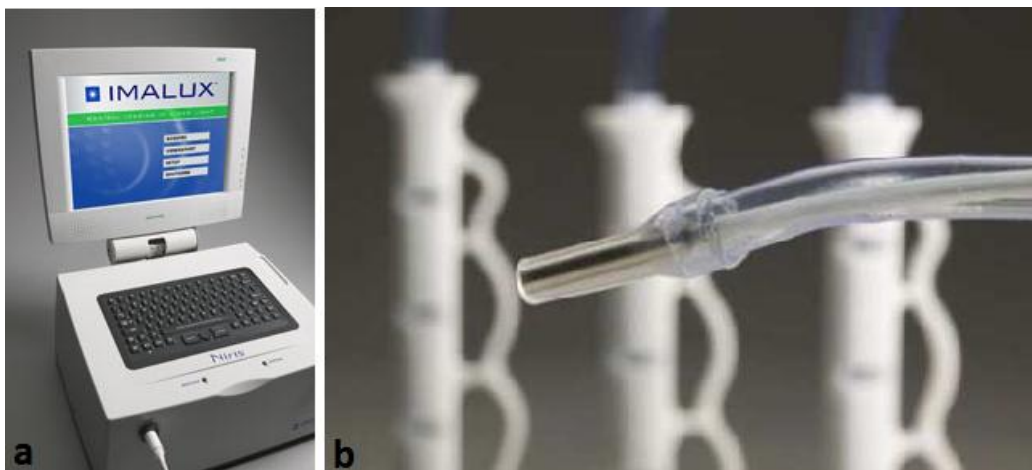


Abb. 11: a) Imalux Niris® TD-OCT Modell, Bildschirm und Tastatur, b) Optische Sonde (Niris®Imaging System) in steriler Einmalhülle (Niris®Probe Sheath).

3.3 Verwendete Agenzien

In dieser Arbeit wurden die Konuspräparate je nach Versuchsgruppe mit jeweils einem der folgenden drei Agenzien behandelt (Tab. 7):

Agens	Ethansäure Trivialname: Essigsäure	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Polyethylenglykol (PEG 400)
Stoffgruppe	Carbonsäuren	Sulfoxide	Glykoether
Strukturformel [123]	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{CH}_3$	$\text{H}-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \right]_n-\text{OH}$
Konzentration (Restanteil Wasser)	6 %	≥ 99,9 %	≥ 99,5 %
Form/Farbe	Flüssig/farblos	Flüssig/farblos	Viskös/farblos
Hersteller	Hausapotheke, Klinikum Innenstadt, 80336 München	WAK Chemie Medical GmbH, 61499 Steinbach	SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, MO 63103, USA

Tab. 7: Stoffgruppe, Strukturformel, Konzentration, Form/Farbe sowie Hersteller der verwendeten Agenzien.

Die bereits beschriebene Essigsäurereaktion des Zervixepithels ist von der Konzentration der Essigsäure abhängig und kann ab 3% beobachtet werden. Die Reaktion kann ebenfalls durch andere wasserlösliche Monocarbonsäuren wie beispielsweise der Methansäure (Formalinsäure) reproduziert werden. Dabei ist der undissoziierte Zustand der Säure für die Wirkung von Bedeutung [72]. Die für diese Arbeit verwendete Essigsäure ist im Vergleich zu der routinemäßig in der Kolposkopie verwendeten Essigsäure (3-5%) mit 6% gering höher konzentriert.

DMSO lässt sich als dipolares Lösungsmittel leicht in Wasser lösen, sowie mit anderen Lösungsmitteln (Alkoholen, Estern) mischen [112]. In hoher Konzentration besitzt DMSO bei Raumtemperatur zytotoxische Eigenschaften, in geringen Konzentrationen (< 10 %) ist es jedoch unbedenklich und wird daher aufgrund seiner Fähigkeit zur leichten Haut- und

Zellwandpenetration als Trägersubstanz in der Medizin angewandt. Substanzen, die in DMSO gelöst wurden, werden vom Organismus über die Haut leichter aufgenommen [124]. Weiterhin kommt es auch zur Kryokonservierung, als im Zellinneren wirksames Gefrierschutzmittel zum Einsatz [125].

PEG ist als pharmazeutischer Hilfsstoff, beispielsweise bei der Abbauhemmung von Medikamenten durch Pegylierung, weit verbreitet und zeichnet sich durch ein gut untersuchtes Sicherheitsprofil sowie seiner guten Verträglichkeit aus. PEG besitzt eine Zulassung durch die Food and Drug Administration (FDA) [126]. Eine PEG-Kette setzt sich aus mehreren Grundeinheiten (C_2H_4O , siehe Strukturformel Tab. 7), mit einer jeweiligen relativen Molekülmasse von 44, zusammen. Je nachdem wie viele Grundeinheiten aneinandergereiht werden ergibt sich ein unterschiedlich großes Molekül, welches ein Vielfaches der Molekülmasse der Grundeinheit ist. In unserer Studie wurde analog zu vielen anderen Studien, welche sich mit dem Thema des tissue optical clearing (TOC) befassen haben ein Molekül mit der Masse 400 Da gewählt (PEG 400). PEG zählt zu den hygroskopischen (wasseranziehenden) Substanzen und lässt sich in Wasser leicht lösen, ist folglich hydrophil [123]. Aufgrund der zwei Hydroxylgruppen gehört PEG chemisch zu den Diolen und zählt somit zu der Kategorie der Alkohole unter den clearing agents [117].

3.4 Versuchsablauf

Im Operationssaal wurde nach erfolgter Spiegeleinstellung die Transformationszone sowohl in nativ als auch nach dem Auftragen von Lugol'scher Lösung betrachtet und fotografisch dokumentiert, um sich später am ex vivo Präparat besser orientieren zu können (Abb. 12).

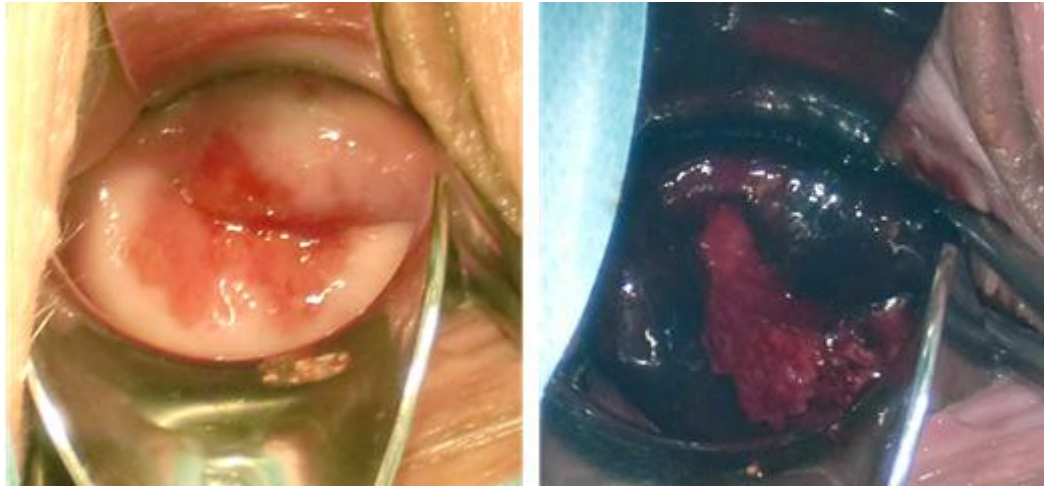


Abb. 12: Intraoperative Spiegeleinstellung der Portio in nativ (links) sowie nach dem Auftragen von Lugol'scher Lösung (rechts). Die Histologie ergab eine CIN 3 Läsion bei 12 Uhr, sowie in den Quadranten 3-6 und 6-9 Uhr.

Der entnommene Ektozervikalkonus wurde im OP zur räumlichen Orientierung fadenmarkiert (für gewöhnlich bei 12 Uhr) und in ein Gefäß mit 0,9% NaCl Lösung gegeben. Im Anschluss an die OP wurde das Präparat mittels optischer Kohärenztomographie untersucht. Die Aufbewahrung in 0,9% NaCl betrug nie über vier Stunden. Dieses ex vivo Modell wurde zuvor durch eine Studie von Gallwas et al. (2012) validiert [127].

Zur Untersuchung wurde das Präparat entsprechend Abbildung 13 mit vier Stecknadeln auf einer Korkplatte fixiert. Es wurde darauf geachtet, dass das Epithel durch die Stecknadeln nicht verletzt wurde. Das Präparat wurde immer so fixiert, dass die Orientierung der Fadenmarkierung auf der Korkplatte mit derjenigen im OP Situs übereinstimmte. Dies war auch für die Beschriftung der OCT-Bilder und für den späteren Vergleich mit dem histologischen Befund durch die Pathologie von Bedeutung. Vor jeder Untersuchung wurde eine Schutzhülle über die Sonde gezogen, da diese mit dem Gewebe in direktem Kontakt gebracht wurde. Anschließend wurde mit der Untersuchung begonnen.

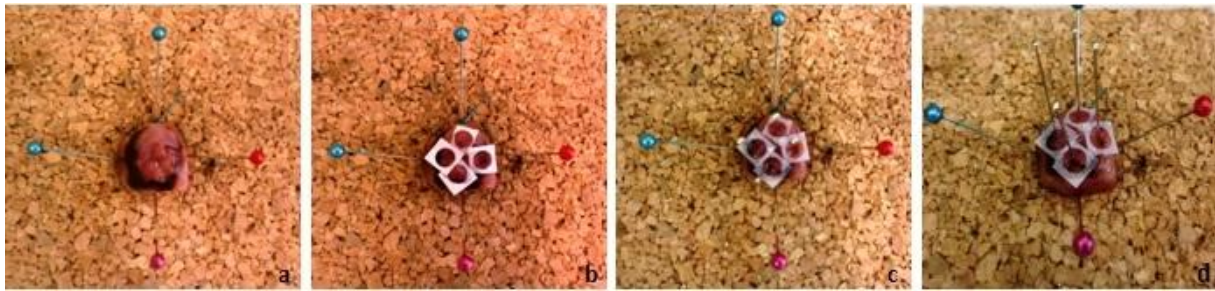


Abb. 13: Auf einer Korkplatte fixiertes Konuspräparat, **a)** zu Beginn der Untersuchung, **b)** mit Papierkreisen zur Markierung der untersuchten Stelle, mit Nadelmarkierungen für die histopathologische Untersuchung von oben **c)** und von der Seite **d)** betrachtet.

Die Sonde wurde mit dem Gewebe in Kontakt gebracht und die gesamte Präparatoberfläche zur Orientierung mittels OCT einmal betrachtet. Die Lokalisationen bei 12, 3, 6 und 9 Uhr wurden bei jedem Patienten zunächst einmal in nativ erfasst. In einigen Fällen wurde auch an bis zu zwei weiteren Stellen, zusätzlich zu den Routinelokalisationen, ein Bild gemacht. Die ausgewählten Stellen wurden durch das Auflegen eines Papierkreises, welcher exakt dem Durchmesser der Sonde plus Schutzhülle entsprach, markiert. Daraufhin wurde je nach Untersuchungsgruppe entweder 6%ige Essigsäure, DMSO oder PEG mit einer 5 ml Spritze auf das Präparat aufgetragen bis die Oberfläche komplett benetzt war. Eine Stoppuhr wurde zur Überwachung der Einwirkzeit parallel gestellt. Die zuvor in nativ erfassten Lokalisationen wurden jeweils nach Einwirkzeiten von 3 und 10 Minuten unter Essigeinwirkung bzw. 5, 10 und 20 Minuten nach Einwirkung von DMSO bzw. PEG erneut erfasst. Die Einhaltung der immer gleichen Lokalisationen wurde durch die Papierkreise vereinfacht. Durch die Applikation der Agenzien wurden diese befeuchtet und konnten somit besser auf ihrer Unterlage haften.

Am Ende der Untersuchung wurden die untersuchten Lokalisationen mit Stecknadeln für die Pathologie markiert. Die Stecknadeln wurden dabei immer genau in die Mitte eines Papierkreises gesteckt und das Präparat daraufhin zur Konservierung in Formalin gegeben. Die durch die Untersuchung gewonnenen Bilder wurden abgespeichert und konnten dann zu einem späteren Zeitpunkt beurteilt werden.

3.5 Datenauswertung und Statistik

Die OCT Bilder wurden durch das Programm PresTo – The Tomogram Presentator (32-bit edition, version 2006.05.05, © 2004 IAP RAS Nizhny Novgorod) auf einem Rechner geöffnet und als TMG-Dateien abgespeichert. Die Bilder wurden anonymisiert, nach Lokalisation, dem verwendeten Agens sowie dessen Einwirkzeit geordnet und in eine Power Point Datei (Microsoft® Office PowerPoint® 2007 SP3) zusammen mit dem entsprechenden histologischen Bild derselben Stelle eingefügt. Alle histopathologischen Befunde wurden durch das pathologische Institut der Ludwigs-Maximilians-Universität München erhoben und das Areal im Umkreis von 3 mm um die Nadelmarkierung, das heißt der gesamte durch die OCT-Sonde erfasste Bereich, mit schwarzer Tusche markiert. So war zu einem späteren Zeitpunkt eine Orientierung anhand der Tuschemarkierung auf den Objektträgern problemlos möglich. Die Befunde wurden mittels eines Photomikroskops (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 37081 Göttingen, Deutschland) dokumentiert. Die Daten der Patientinnen, wie beispielsweise das Alter und Untersuchungsdatum wurden nach Maßgabe der Ethikkommission verschlüsselt und zusammen mit den klinischen Vorbefunden (prä-/postmenopausal, vorangegangene Konisation, Pap Abstrich, HPV Status, Kolposkopie sowie der Anzahl, Lokalisation und dem histopathologischen Befund der Probeexzision) in eine Excel Tabelle (Microsoft® Office Excel® 2007 SP3) eingetragen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen renommierten Statistiker (Herr Prof. Dr. U. Mortensen, Westfälische Wilhelms-Universität Münster).

3.5.1 Befundung der OCT-Bilder

Die Befundung der zuvor akquirierten OCT-Bilder fand nicht in Echtzeit, sondern zu einem späteren Zeitpunkt durch eine unabhängige, in der Befundung von OCT-Bildern erfahrene Untersucherin statt. Die OCT Bilder wurden für die Befundung anonymisiert und bezüglich der Lokalisation, des verwendeten Agens sowie dessen Einwirkzeit und der klinischen Vorbefunde, wie beispielsweise dem Pap Abstrich, dem HPV Status, dem kolposkopischen sowie dem histologischen Befund von der Doktorandin einfach verblindet. Die OCT Bilder wurden in folgende Befundklassen eingeteilt: Normales Plattenepithel, Zylinderepithel, Entzündung, CIN 1, CIN 2, CIN 3 und Karzinom. Zur Auswertung der OCT-Bilder wurden die von Escobar et al. erstmals entwickelten und in unseren Vorgängerstudien durch Gallwas et al. präzisierten und ergänzten Kriterien, wie das Vorhandensein einer Dreischichtung oder dem optischen Eindruck eines säulenartigen Empordrängen des Stromas bei fehlender

Schichtung, die klare Abgrenzung des Epithels vom Stroma durch die Basalmembran, die Lichteindringtiefe und die Signalintensität des Epithels herangezogen [94, 104-106].

3.5.2 Kontingenztabelle zum Vergleich von OCT und Histologie

Die Ergebnisse der Befundung der OCT-Bilder wurden für jede Agens-Gruppe (Essigsäure, DMSO und PEG) getrennt in eine Kontingenztabelle gegen die histopathologischen Befunde der entsprechenden Läsionen eingetragen. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich zwischen OCT und der Histologie als Goldstandard. Daraus konnte die Übereinstimmungsrate zwischen der OCT und Histopathologie getrennt nach verwendetem Agens, nach Einwirkzeit und Befundgruppe betrachtet werden.

3.5.3 Rating der OCT-Bilder

Die OCT-Bilder wurden wie bereits erwähnt anonymisiert, nach Lokalisation sortiert und die neutralen Aufnahmen, welche ohne die Einwirkung eines Agens erfolgten, den Aufnahmen nach 3- und 10-minütiger Einwirkzeit (Essigsäure), bzw. nach 5-,10- und 20-minütiger Einwirkzeit (DMSO und PEG) gegenübergestellt. Dabei wurden immer diejenigen Bilder, die unter einer bestimmten Einwirkzeit eines der drei verwendeten Agenzien aufgenommen wurden, mit dem jeweiligen neutralen Bild derselben Patientin und Lokalisation bezüglich der drei Kriterien Helligkeit, Kontrast und Tiefe verglichen und bewertet (engl. rate). Für diesen Vergleich wurde eine Skala von 1 bis 5 verwendet, wobei die Vergabe des Urteils oder Ratings 3 „kein Unterschied zum neutralen Bild“ bedeutete. Das Rating 1 bedeutet eine starke Abnahme, während das Rating 2 auf eine Abnahme hinwies. Das Rating 4 wurde bei Zunahme und das Rating 5 bei starker Zunahme des bewerteten Kriteriums gegenüber dem neutralen Bild vergeben. Zur Verdeutlichung ist die verwendete Skala in Abbildung 14 nochmals dargestellt.

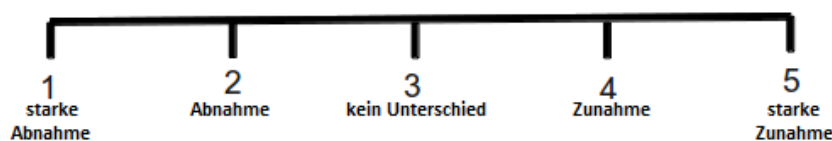


Abb. 14: Darstellung der verwendeten Ratingskala.

Die OCT-Bilder der unbehandelten Präparate wurden nicht in das Rating einbezogen. Sie dienten als neutraler Referenzpunkt mit dem die OCT-Bilder desselben Areals nach dem Auftragen einer der untersuchten Agenzien zu den verschiedenen Einwirkzeiten verglichen wurden. Dadurch fiel die morphologische Heterogenität der OCT-Bilder, die natürlicherweise durch die interindividuellen Unterschiede der Patientinnen bezüglich des Gewebes entstand, bei dem Rating nicht ins Gewicht. Es wurde dann für alle drei Kategorien statistisch geprüft ob die Nullhypothese

H0: „Die Ratingvergabe erfolgt zufällig, d.h. in diesem Fall mit gleicher Wahrscheinlichkeit. Die Häufigkeiten der Ratingurteile werden dementsprechend als gleichverteilt angenommen, es besteht kein systematischer Bezug zur verwendeten Substanz und deren Einwirkzeit“

zutrifft, oder ob bezüglich der Substanz und deren Einwirkzeit gewisse Tendenzen in der Ratingvergabe zu erkennen sind und die Nullhypothese somit verworfen werden kann. Die Auswertung erfolgte anhand des Standardtests für die Prüfung auf Gleichverteilung mehrerer Anteile, mithilfe des Programms `prop.test` aus dem `stat`-Paket des Programms R [128, 129]. Aufgrund der geringen Fallzahlen und der häufigen Vergabe des Ratings 3 entschieden wir uns nachträglich für eine Dichotomisierung der zuvor verwendeten Ratingskala (Abb. 15). Die Ratings 1 und 2 sowie 4 und 5 wurden jeweils in eine Abnahme- und in eine Zunahmegruppe zusammengefasst. Die Fälle bei denen eine 3 als Rating vergeben wurde, wurden zu gleichen Anteilen auf die Abnahme- sowie auf die Zunahmegruppe verteilt.

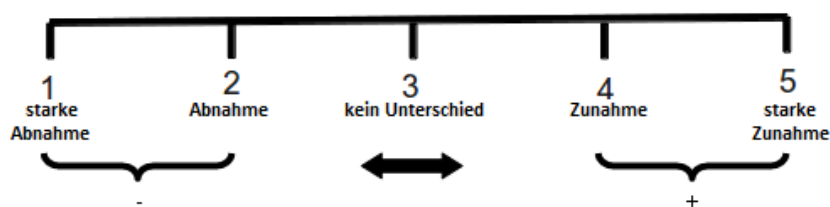


Abb. 15: Dichotomisierung der Ratingskala in eine Abnahme- (-) sowie in eine Zunahmegruppe (+).

Damit wurde eine forced choice-Beurteilung emuliert. Diese wird angewendet, um eine überproportionale und damit fehlerhafte Häufung von Urteilen für die neutrale Kategorie zu vermeiden. Derartige Häufungen ergeben sich als Resultat von Urteilsfehlern. Diese entstehen dann, wenn die urteilenden Personen mit ihren Urteilen eher ihre Unsicherheit als ihre tatsächliche Wahrnehmung dokumentieren. Man kann davon ausgehen, dass in ungefähr der Hälfte der Fälle, in denen die beurteilenden Personen die neutrale Kategorie 3 wählen,

tatsächlich eine Abnahme oder Zunahme des jeweils zu beurteilenden Merkmals wahrgenommen wurde. Dieser Annahme folgend wurde die Hälfte der Fälle in der Kategorie 3 den Abnahme- und die andere Hälfte den Zunahmeerurteilen zugeordnet. Die Nullhypothese H_0 wurde für die Verteilung der Rating-Urteile der einzelnen Einwirkzeiten überprüft. Bei dem verwendeten Test handelt es sich um einen χ^2 -Test [130]. Dieser testet ob die tatsächlich beobachteten Häufigkeiten der Rating-Urteile signifikant von den unter der Nullhypothese erwarteten abweichen. Unser Hauptaugenmerk legten wir auf die einseitige Testung, die auf eine bestimmte Richtung der Abweichung zielt. In unserem Fall wurde getestet ob die beobachtete Häufigkeit der Zunahmeerurteile (+) signifikant von der unter der Nullhypothese H_0 erwarteten abweicht. Beim zweiseitigen Test wird die Nullhypothese H_0 sowohl für die Häufigkeit der Zunahme- als auch der Abnahmeerurteile geprüft. Da ein signifikant häufiger vergebenes Zunahmeerurteil für ein Merkmal zu gegebenen Bedingungen (Agens und Eiwirkzeit) gleichzeitig auch eine signifikant niedrigere Vergabe eines Abnahmeerurteils impliziert wurde im Ergebnisteil lediglich der p-Wert für den einseitigen Test angegeben. Die p-Werte für den zweiseitigen Test entsprechen dabei den doppelten p-Werten des einseitigen Tests ($p(\text{zweiseitig}) = 2p(\text{einseitig})$).

3.5.4 Vergleich der Helligkeiten durch Helligkeitsprofile

Zuletzt wurde für jedes OCT Bild ein Helligkeitsprofil mithilfe des Programms ImageJ 1.46r (Java 1.6.0_20 (64-bit), Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) erstellt. Durch dieses Programm wird die Helligkeit jedes einzelnen Pixels im gewählten Bereich erfasst und es wird immer jeweils über die Helligkeitswerte einer horizontalen Pixelreihe (Image point) gemittelt. Die gemittelten Helligkeitswerte jeder Reihe werden dann in einer Grafik dargestellt, in der die Helligkeitswerte (auf der Ordinate) gegen die Image points (auf der Abszisse) aufgetragen werden (Abb. 16).

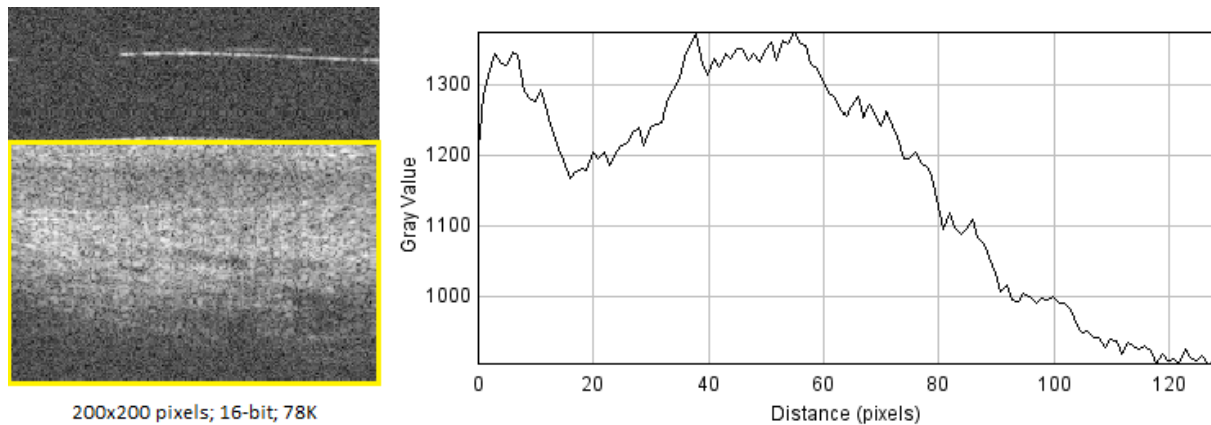


Abb. 16: Erstellung eines Helligkeitsprofils aus einem OCT Bild. Links: OCT Querschnittsaufnahme aus gesundem zervikalen Plattenepithel. Das gelb markierte Areal stellt den Bereich dar, aus dem das Helligkeitsprofil erstellt wird. Rechts: Axiales Helligkeitsprofil aus den gemittelten Helligkeitswerten der Pixel einer horizontalen Reihe (Image point).

Der gelbe Bereich wurde manuell stets so gewählt, dass das Helligkeitsprofil ab dem Gewebebeginn erstellt wurde. Der davorliegende sog. „Leerlaufbereich“ zwischen dem Ende der Sonde und Gewebebeginn, welcher keine für uns relevanten Informationen enthält, wurde somit ausgespart. Damit erklärt sich auch die geringere Pixelanzahl von 120 auf der Abszisse gegenüber der angegebenen Pixelanzahl von 200x200. Für jede Befundgruppe (Normalbefund, Inflammation, Zylinderepithel, CIN 1, CIN 2, CIN 3) wurde aus den einzelnen Helligkeitsprofilen ein mittleres Helligkeitsprofil berechnet. Ein einzelnes Helligkeitsprofil ist also eine Folge h_1, h_2, \dots, h_n von Helligkeitswerten, wobei der Index die Position (Image point) des entsprechenden Helligkeitswertes kennzeichnet. h_j heißt auch die j -te Komponente, $j = 1, \dots, n$ des Profils. Bei einem mittleren Helligkeitsprofil sind die Komponenten \bar{h}_j mittlere Helligkeiten. Die Profile wurden in Bezug auf ein 2-dimensionales Kategoriensystem zu Gruppen zusammengefasst. Eine Dimension ist das jeweils verwendete Agens (Essigsäure, DMSO und PEG), die zweite die Einwirkzeit (0, 3, 5, 10 und 20 Minuten). Es gibt demnach die Gruppen Essigsäure (0-, 3- und 10- Minuten) sowie DMSO und PEG (beide jeweils 0-, 5-, 10- und 20- Minuten). Die Gruppen Essigsäure 0-Minuten, DMSO 0-Minuten, sowie PEG 0-Minuten wurden zur Vereinfachung als „neutral“-Gruppe bezeichnet, da sie die Profile der OCT-Bilder vor dem Auftragen eines Agens auf das jeweilige Präparat repräsentieren. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen in den übrigen Befundgruppen wurden lediglich die Normalbefunde, CIN 3 und Inflammationen/bzw. CIN 2 (bei DMSO) statistisch ausgewertet. Darüber hinaus wurden für jede Gruppe mittlere Differenzprofile berechnet, die den Effekt der verschiedenen Einwirkzeiten zeigen sollen. Für ein gegebenes Agens seien P_j

und P_k die mittleren Helligkeitsprofile für die Einwirkzeiten $j \neq k$, $j = 0$ Minuten bis $j = 20$ Minuten und $k = 0$ Minuten bis $k = 20$ Minuten. Ein mittleres Differenzprofil ist dann durch $P_{jk} = P_j - P_k$ gegeben, wobei j stets die im Vergleich zu k längere Einwirkzeit ist. P_{jk} besteht aus den Differenzen der mittleren Helligkeitswerte $\bar{h}_{ij} - \bar{h}_{ik}$, $i = 1, \dots, n$.

Unter der Annahme, dass keine Unterschiede zwischen der neutralen Bedingung und den Bedingungen unter den verschiedenen Einwirkzeiten der Agenzien bestehen – dies ist die Nullhypothese H_0 - müssten die mittleren Differenzkurven ohne signifikante Abweichung von der Nulllinie um eben diese Linie fluktuieren. Die Alternativhypothese ist, dass die Differenzprofile einen systematischen Trend enthalten, der signifikante Abweichungen von der Nulllinie impliziert. Derartige Trends würden dann systematische und nicht nur zufällige Effekte der verschiedenen Einwirkzeiten reflektieren.

Die Nullhypothese kann auf verschiedene Weisen, d.h. mit verschiedenen Tests geprüft werden. Die Tests, die in unserer Studie Anwendung fanden, lassen sich wie folgt unterteilen:

1. Tests vom Hotelling Typ
2. Trend-Tests (Runs-Test, KPSS-Test und ADF-Test)

Diese Tests sollen im Folgenden vorgestellt und näher erläutert werden:

1. Tests vom Hotelling Typ: Es wird der Frage nachgegangen ob in einem Differenzprofil überhaupt Differenzen vorkommen, die größer sind als mit der Nullhypothese kompatibel ist. Dabei wird die Varianz der Differenzen um einen hypothetischen Mittelwert μ_0 betrachtet. Es wird angenommen, dass die Differenzen multivariat normalverteilt sind, wobei gemäß der hier betrachteten Nullhypothese der Erwartungswert der Differenzen $\mu_0 = 0$ ist. Die Differenzen dürfen paarweise korreliert sein. Prinzipiell genügt es, dass einzelne Differenzen, im Extremfall sogar nur eine Differenz des Differenzprofils, hinreichend groß sind, damit die T^2 -Statistik größer wird als der kritische Wert. Diese großen Differenzen können dabei irgendwo im Differenzprofil auftreten und müssen nicht in einem zusammenhängenden Bereich von Image points auftreten. Es existieren verschiedene Versionen dieses Tests. Im Falle unserer Studie wurde diejenige Version verwendet, bei der nur ein einzelnes Differenzprofil gegeben ist. Andere Versionen, bei denen über verschiedene Differenzprofile gemittelt wird, konnten wegen der relativ geringen Fallzahlen nicht verwendet werden. Bei diesem Test sind zwei grundsätzliche Punkte zu beachten: es ist möglicherweise nicht sinnvoll, die Nullhypothese zu verwerfen, wenn etwa nur sehr wenige Differenzen oder gar

nur eine einzige signifikant von Null abweicht. Demnach schien es angebracht, nach weiteren Verfahren zu suchen, die auf weniger restriktiven Annahmen beruhen.

2. Trend-Tests: Möglicherweise ist die Größe einzelner oder verschiedener Differenzen gar nicht der für die Nullhypothese relevante Aspekt der Differenzprofile, sondern vielmehr die Trends. Als Trends werden in diesem Fall bestimmte hinreichend große Bereiche von Image points, über die alle Differenzen entweder positiv oder negativ sind, bezeichnet. Dabei stellte sich die Frage was unter „hinreichend groß“ verstanden werden soll. Eine Möglichkeit ist „hinreichend groß“ durch den Begriff einer „überzufällig langen“ Folge von Image points zu spezifizieren; dieser Ansatz liegt dem Runs-Test zugrunde. Eine andere Möglichkeit ist, „hinreichend groß“ über einen linearen oder auch nichtlinearen Trend von größer bzw. kleiner werdenden Differenzen zu spezifizieren. Solch ein Ansatz liegt dem KPSS-Test (für lineare Trends) und dem ADF-Test (sowohl für lineare als auch für nichtlineare Trends) zugrunde.

Beim Runs-Test wird die Nullhypothese durch die Annahme spezifiziert, dass positive und negative Differenzen stochastisch unabhängig aufeinander folgen, wobei die Wahrscheinlichkeit, dass für einen gegebenen Image point die entsprechende Differenz positiv bzw. negativ ist, $p = \frac{1}{2}$ ist. Für $p \neq \frac{1}{2}$, also $p > \frac{1}{2}$ oder $p < \frac{1}{2}$, ergibt sich ein stochastischer Trend von größer oder kleiner werdenden Differenzen, der gegen die Nullhypothese sprechen würde¹. Die Unabhängigkeitsannahme widerspricht nicht der Möglichkeit, dass Trends existieren, denn ein Agens (Essigsäure, DMSO oder PEG) kann ja gleichförmig auf einen Abschnitt der Gewebeprobe wirken, sprich die Rückstreuung der Zellen in diesem Abschnitt gleichförmig erhöhen oder erniedrigen. Die Länge einer Folge von Image points mit entweder positiven oder negativen Differenzen ist dann geometrisch verteilt mit dem Parameter $p = \frac{1}{2}$. Treten in einem Differenzprofil Folgen auf, die bei dieser Verteilung sehr unwahrscheinlich sind ($p(\text{Folge}) < 0.05$) verwirft der Runs-Test die Nullhypothese. Um die mögliche Existenz solcher Trends zu testen, wurde der Runs-Test (runs.test im R-package (tseries)) durchgeführt [131].

Nimmt man hingegen einen linearen Trend an, so wird nur getestet, ob z.B. die Helligkeitsdifferenzen am Anfang eines Differenzprofils im Mittel größer sind als am Ende, oder umgekehrt. Es ist, als wolle man eine Regressionsgerade an ein Differenzprofil anpassen. Ist der Regressionsparameter, also das Steigmaß der Geraden, von Null verschieden, so kann

¹ Anmerkung Dr. H. Stepp, Laser-Forschungslabor, Klinikum der Universität München: „Die Annahme der stochastischen Unabhängigkeit der Helligkeitswerte jedes 4.-5. Pixels ergibt sich aus der Physik des OCT“.

man sagen, dass ein globaler linearer Trend existiert. Gilt die Nullhypothese, so ist der Regressionsparameter, sprich die Steigung der Regressionsgeraden, nicht signifikant von Null verschieden. Dabei ist zu beachten, dass das geprüfte Differenzprofil dazu keinesfalls einen von großen zu kleinen Werten linearen Verlauf haben muss. Liefert ein derartiger Test also ein signifikantes Ergebnis, so sagt es nur wenig über die Form des Trends aus. Es wird stattdessen nur signalisiert, ob die Differenzen am Anfangs- oder Endteil des Differenzprofils größer sind als am End- oder Anfangsteil. Die Größe der Differenzen spielt dabei keine besondere Rolle, wichtig ist nur, dass für eine Folge von Image points die Differenzen größer bzw. kleiner als Null sind. Dies wurde anhand des KPSS-Tests von Kwiatkowski, Phillips, Schmidt und Shin (`kpss.test` im R-package (`tseries`)) statistisch geprüft [129, 132]. Der KPSS-Test wurde im Kontext der Analyse von Zeitreihen entwickelt, d.h. die Folge der Differenzen $h_{i1} - h_{k1}, \dots, h_{in} - h_{kn}$ kann formal als „Zeit“-Reihe, bzw. in unserem Fall als „Ortsreihe“, aufgefasst werden [133]. Die absolute Größe der Differenzen spielt bei diesen Tests wiederum keine Rolle. Man kann jedoch auch von einem nichtlinearen Trend ausgehen. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass es viele Arten von Nichtlinearitäten gibt. Deswegen ist es notwendig eine möglichst allgemeine Art der Spezifikation zu finden, die auf möglichst viele Arten von Nichtlinearitäten zutrifft. Ein genereller Ansatz besteht wieder darin, ein Resultat aus der Analyse von Zeit- bzw. Ortsreihen zu verwenden. Diese repräsentieren stochastische Prozesse, und können entweder stationär – wenn kein Trend existiert – oder nichtstationär – wenn ein Trend, ganz gleich ob dieser nun linear oder nichtlinear ist, existiert – sein. Man kann also ein Differenzprofil auf Stationarität prüfen, um die Hypothese der Existenz irgendeines Trends zu testen. Auch in diesem Fall gilt, dass die Existenz eines Trends bedeutet, dass es zusammenhängende Bereiche von Image points gibt, in denen die Helligkeitswerte entweder alle größer oder kleiner als Null sind. Die absolute Größe der Abweichung von Null spielt, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle. Zu diesem Zweck wurde der „augmented Dickey-Fuller-Test“ (`adf.test` im R-package (`tseries`)) herangezogen [134]. Unsere Nullhypothese (es existiert kein Trend) wird bei diesem Test im Gegensatz zu den anderen aus mathematischen Gründen allerdings anders formuliert. Die beim ADF-Test betrachtete Nullhypothese besagt, dass ein Trend – möglicherweise nichtlinear – existiert. Ein großer p -Wert ($p > 0.05$) besagt demnach, dass die Hypothese eines Trends nicht zurückgewiesen wird, womit unsere Nullhypothese zurückgewiesen wird. Auch bei diesem Test spielt die absolute Größe der Differenzen keine Rolle.

4. Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

4.1.1 Analyse des Patientenkollektivs

Für die vorliegende Studie wurden 34 Patientinnen über einen Zeitraum von 11 Monaten (Dezember 2012 bis Oktober 2013) rekrutiert. Das Alter der Teilnehmerinnen reichte von 22 bis 49 Jahren (durchschnittliches Alter 32,57 Jahre). 33 Patientinnen waren prämenopausal, eine Patientin postmenopausal. Der Pap-Abstrich ergab bei 22 Patientinnen einen Pap IVa, bei 9 Patientinnen einen Pap IIID und bei zwei Patientinnen jeweils einen Pap III und Pap IIw. In einem Fall wurde in der Sprechstunde kein Pap-Abstrich abgenommen. 30 der Patientinnen erwiesen sich als HPV high risk positiv, während 2 Patientinnen HPV negativ waren. Bei zwei Patientinnen wurde der HPV-Status nicht erhoben. Von den Studienteilnehmerinnen wurden in 30 Fällen präoperativ jeweils eine oder mehrere Biopsien entnommen, während in einem Fall eine endozervikale Kürettage (ECC) und in einem anderen ein intraoperativ gewonnener Zervixpolyp zur histologischen Sicherung der Läsion dienten. Bei zwei Patientinnen erfolgte keine Biopsie. Die Indikation zur Konisation mittels LEEP wurde in 27 Fällen aufgrund einer histologisch gesicherten CIN 3 gestellt. In 3 Fällen lag eine CIN 2 vor und in 4 Fällen konnte trotz eines wiederholt auffälligen Pap-Abstrichs (3 Fälle Pap IVa und in einem Pap IIID) histologisch keine Dysplasie gesichert werden (darunter auch die zwei nicht biopsierten Patientinnen). In diesen Fällen wurde die Indikation aufgrund des wiederholt auffälligen Pap-Abstrichs und des auffälligen kolposkopischen Befunds bei abgeschlossener Familienplanung gestellt.

33 der untersuchten Präparate stammten aus Erstkonisationen, ein Präparat wurde durch eine Rekonisation gewonnen. Die Präparate der Patientinnen, jeweils ein Konus pro Patientin, wurden entsprechend der drei untersuchten Agenzien (Essigsäure, DMSO und PEG) in drei Gruppen mit jeweils 10, 11 und 13 Präparaten aufgeteilt. Eine Übersicht über die während der Sprechstunde erhobenen Befunde je nach Agens-Gruppe getrennt gibt Tabelle 8.

	Essigsäure- Patientinnen	DMSO- Patientinnen	PEG- Patientinnen	Insgesamt
Anzahl der Patientinnen	10	11	13	34
Altersspanne (ø Alter)	22-49 (ø32,9)	24-42 (ø30,3)	25-47 (ø34,5)	22-49 (ø32,57)
prämenopausal	9	11	13	33
postmenopausal	1	0	0	1
HPV-HR positiv	7	11	12	30
HPV-HR negativ	2	0	0	2
HPV nicht erhoben	1	0	1	2
Pap IVA	6	8	8	22
Pap IIID	3	3	3	9
Pap III	0	0	1	1
Pap IIw	0	0	1	1
Pap nicht erhoben	1	0	0	1
PE	8	10	12	30
PE nicht entnommen	0	1	1	2
ECC	1	0	0	1
Zervixpolyp (intraop.)	1	0	0	1
CIN 3	9	8	10	27
CIN 2	0	1	2	3
Dysplasie nicht gesichert (Pap-Test wiederholt auffällig)	1	2	1	4
Erstkonisation	9	11	13	33
Rekonisation	1	0	0	1

Tab. 8: Zusammenfassung der Befunde aller Studienteilnehmerinnen nach Agens-Gruppe aufgetrennt.

4.1.2 Analyse des Bildmaterials

Es wurden pro Patientin immer mindestens 4 und höchstens 6 unterschiedliche Lokalisationen am selben Konus, unmittelbar nach Entnahme, mittels OCT untersucht und zu einem späteren Zeitpunkt mit dem entsprechenden histologischen Befund korreliert. Das ergab dann insgesamt 155 verschiedene Lokalisationen bei 34 Konisationspräparaten und durchschnittlich 4,6 Lokalisationen pro Patientin und Konus. Die Präparate wurden jeweils immer mit nur einer der drei zu untersuchenden Agenzien behandelt wodurch sich drei Gruppen ergaben. Es wurden pro Präparat immer dieselben Lokalisationen einmal in nativ und dann jeweils immer nach den verschiedenen Einwirkzeiten eines Agens (bei Essigsäure jeweils nach 3 und 10 Minuten, bei DMSO und PEG jeweils nach 5, 10 und 20 Minuten) mittels OCT erfasst und abgespeichert. Dadurch konnten insgesamt 571 OCT-Bilder erhalten werden, was einer durchschnittlichen Anzahl von 16,8 OCT-Bildern pro Patientin entspricht. 3 OCT-Bilder (ein Bild der Essigsäuregruppe nach 10 Minuten/ zwei Bilder der DMSO-Gruppe neutral und nach 10 Minuten) gingen während des Speicherprozesses verloren und konnten somit in der Auswertung nicht mitberücksichtigt werden. Die untenstehende Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Fallzahlen pro Agens-Gruppe.

	Patientinnen	Lokalisationen	Bilderanzahl neutral	Bilderanzahl nach 3 Min.	Bilderanzahl nach 5 Min.	Bilderanzahl nach 10 Min.	Bilderanzahl nach 20. Min.	Bilderanzahl insgesamt
Essigsäure	10	46	46	46	-	45	-	137
DMSO	11	51	50	-	51	50	51	202
PEG	13	58	58	-	58	58	58	232
Insgesamt	34	155	154	46	109	153	109	571

Tab. 9: Fallzahlen pro Agens-Gruppe.

Durch die Nadelmarkierungen konnten die unterschiedlichen Lokalisationen der insgesamt 34 Konisationspräparate genau mit dem entsprechenden histologischen Befund korreliert werden. Dieser ergab für die 155 untersuchten Areale in 85 Fällen einen Normalbefund, in 17 Fällen eine Inflammation, in 10 Fällen Zylinderepithel, in 5 Fällen eine CIN 1, in 9 Fällen eine CIN 2 und in 29 Fällen eine CIN 3. Unter den untersuchten Präparaten befand sich kein Karzinom. Eine Übersicht über die histologischen Befunde nach Agens getrennt gibt Tabelle 10.

Histologie	Essigsäure	DMSO	PEG	Insgesamt
Normalbefund	24	28	33	85
Inflammation	6	-	11	17
Zylinderepithel	4	5	1	10
CIN 1	2	1	2	5
CIN 2	1	6	2	9
CIN 3	9	11	9	29
Insgesamt	46	51	58	155

Tab. 10: Histologische Befunde der mittels OCT untersuchten Stellen, nach Agens aufgetrennt.

Die OCT-Bilder wurden zum einen einer qualitativen und zum anderen einer quantitativen Analyse unterzogen um die Wirkung der Essigsäure, sowie der Clearing Agents DMSO und PEG zu untersuchen. Die qualitative Analyse umfasste die Befundung der OCT-Bilder und

den Vergleich mit der entsprechenden Histologie durch einen unabhängigen Untersucher sowie die subjektive Bewertung, das sog. Rating, des Einflusses der Agenzien auf Helligkeit, Kontrast und Tiefe. Alle 571 OCT-Bilder wurden befundet und mit dem entsprechenden histologischen Befund korreliert. Sowohl für das Rating als auch für die quantitative Analyse konnten nicht alle histologischen Befundgruppen berücksichtigt werden, da in manchen Gruppen die Fallzahlen zu niedrig waren um Aussagen über die Wirkung der Agenzien treffen zu können. Für die Entscheidung, welche Befundgruppen in das Rating bzw. in die quantitative Analyse eingeschlossen werden sollten war die Anzahl der Befunde pro Agens-Gruppe von Bedeutung. Der Cut-Off wurde bei einer Befundanzahl, welche mindestens 50 % der untersuchten Patientenzahl entsprach, gewählt. So konnten für die Essigsäuregruppe (10 Patientinnen) die Normalbefunde (24), Inflammation (6) und CIN 3 (9), für die DMSO-Gruppe (11 Patientinnen) die Normalbefunde (28), CIN 2 (6) und CIN 3 (11) und für die PEG-Gruppe (13 Patientinnen) die Normalbefunde (33), Inflammation (11) und CIN 3 (9) berücksichtigt werden (Tab. 11). Damit gingen in das Rating insgesamt 370 OCT-Bilder ein. Zur quantitativen Analyse wurde für jedes OCT-Bild ein Helligkeitsprofil erstellt. In diese Analyse gingen die Helligkeitsprofile von 506 OCT-Bildern ein. Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die Fallzahlen je nach Analyse.

Essigsäure					
Analyse	Lokalisationen	Bilderanzahl	davon Norm.	davon Inflamm.	davon CIN 3
Rating	39	77	47	12	18
Helligkeitsprofile	39	116	71	18	27
DMSO					
Analyse	Lokalisationen	Bilderanzahl	davon Norm.	davon CIN 2	davon CIN 3
Rating	45	134	84	18	32
Helligkeitsprofile	45	178	112	24	42
PEG					
Analyse	Lokalisationen	Bilderanzahl	davon Norm.	davon Inflamm.	davon CIN 3
Rating	53	159	99	33	27
Helligkeitsprofile	53	212	132	44	36
Insgesamt					
Rating	137	370	230	45 (18)	77
Helligkeitsprofile	137	506	315	62 (24)	105

Tab. 11: Übersicht über die Fallzahlen je nach Analyse. Norm.= Normalbefund, Inflamm.= Inflammation.

4.2 Qualitative Bildanalyse

Analog zu den vorangegangenen Studien dieser Arbeitsgruppe wurden alle gewonnenen OCT-Bilder von einer unabhängigen Untersucherin auf Grundlage der im Material und Methoden Teil (3.5.1 Befundung der OCT-Bilder) erwähnten, 2004 durch Escobar et al. erstmals definierten und durch Gallwas et al. später ergänzten Kriterien, befundet [94, 104, 106]. Diese Kriterien konnten auch durch diese Studie nochmals bestätigt werden. Die Befunde wurden dabei in die Kategorien Normalbefund, Inflammation, Zylinderepithel, CIN 1, CIN 2 und CIN 3 eingeteilt. Die Kategorie Karzinom ist in dieser Studie nicht repräsentiert, da sie in unserem Patientenkollektiv laut Histologie nicht vorhanden war und auch durch die Beurteilung mittels OCT von der Untersucherin nicht vergeben wurde. Die morphologischen Kriterien anhand derer das OCT Urteil gefällt wurde sollen im Folgenden an ausgewählten Bildbeispielen (OCT- sowie histologische Bilder) aus unserem eigenen Studienkollektiv beschrieben und erläutert werden.

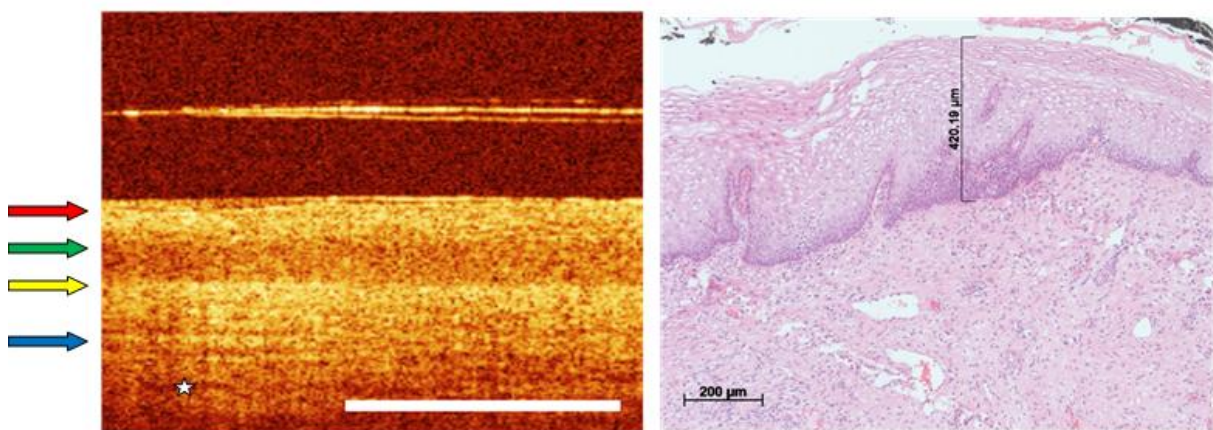


Abb. 17: OCT-Bild eines Normalbefunds (mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel) mit der dazu entsprechenden Histologie rechts. Roter Pfeil: Superfizialzellschicht, grüner Pfeil: Intermediär- und Parabasalzellschicht, gelber Pfeil: Epithel/Stroma-Grenze, indirekt die Basalmembran, blauer Pfeil: Stroma, Sternmarkierung: Blutgefäß im Stroma.

In Abbildung 17 ist ein Normalbefund (mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel) dargestellt. Dieser ist an der charakteristischen Dreischichtung erkennbar. Das Epithel zeigt zu Beginn eine stärker rückstreuende obere Schicht, welche histologisch der Superfizialzellschicht entspricht, auf die eine schwächer rückstreuende, folglich dunklere, die Intermediärzellschicht darstellende Schicht folgt. Die Basalmembran ist zu dünn um durch die OCT direkt dargestellt werden zu können, sie entspricht jedoch der scharfen Abgrenzung zwischen der dunkleren

Intermediärzellschicht und dem stark rückstreuenden und damit sehr hellen oberen Stroma. Unterhalb der Basalmembran beginnt das Stroma welches mit zunehmender Tiefe schwächer rückstreut und somit auch dunkler erscheint. Im Normalfall ist das Stroma jedoch fast über die gesamte Bildtiefe einsehbar. Es können durch die OCT ebenfalls im Stroma liegende Drüsen und Blutgefäße dargestellt werden. Ein solches Blutgefäß ist auch in Abbildung 17 auf dem OCT-Bild (Sternmarkierung) sowie in der dazu entsprechenden Histologie dargestellt.

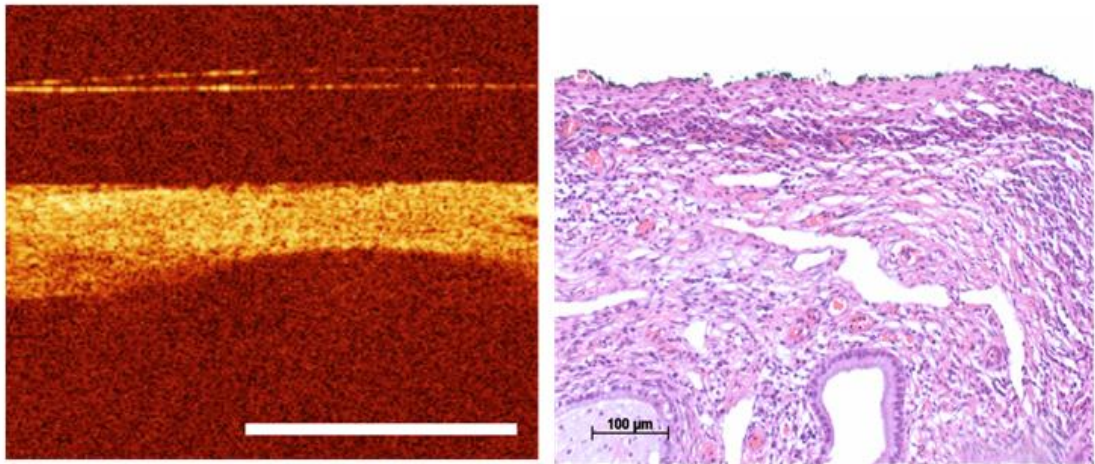


Abb. 18: OCT-Bild einer Inflammation mit der dazu entsprechenden Histologie rechts.

Das OCT-Bild einer Inflammation (Abb. 18) zeigt ein stark signalgebendes Epithel, in dem die einzelnen Schichten nicht mehr differenzierbar sind. Das Stroma ist hingegen durch eine schlagartige Signalabnahme charakterisiert, die bereits ab Stromabeginn komplett ausgeprägt zu sein scheint. Letzteres stellt sich deshalb bereits ab der Basalmembran als völlig dunkel und uneinsehbar dar. Die Abgrenzung zwischen Epithel und Stroma bleibt jedoch erhalten auch wenn sie durch die ödematöse Schwellung des gesamten Gewebes gegenüber dem OCT-Bild eines Normalbefunds unscharf erscheint. Die Histologie zeigt sowohl im Epithel als auch im Stroma entzündliche, vorwiegend lymphozytäre und granulozytäre Zellinfiltrate.

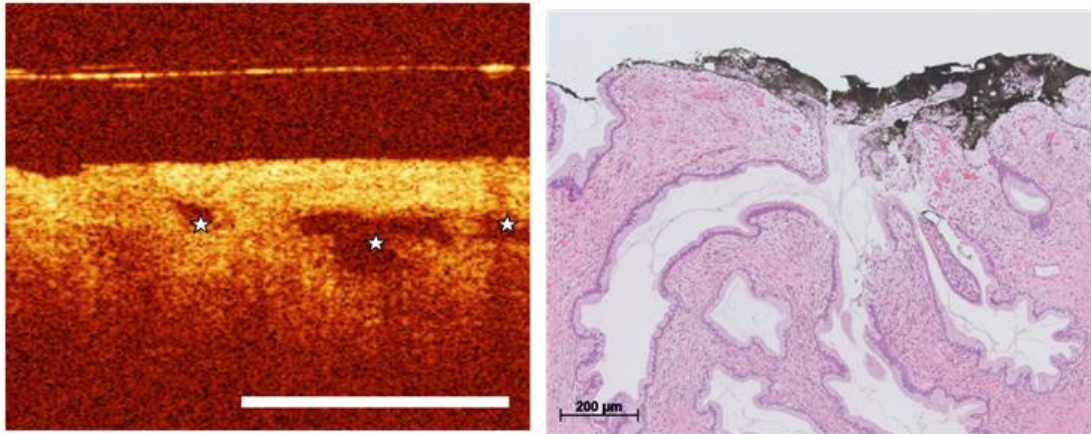


Abb. 19: OCT-Bild von Zylinderepithel mit der dazu entsprechenden tuschemarkierten Histologie rechts.

Das OCT-Bild von Zylinderepithel ist an den gewundenen Drüsengängen zu erkennen, welche über die gesamte Breite des Gewebes verteilt sind (Abb. 19, Sternmarkierungen). Histologisch zeigen sich stark verzweigte, tubulöse Drüsen, die von einschichtig hochprismatischem, schleimbildendem Zylinderepithel bedeckt sind. Auf dem OCT-Bild von Zylinderepithel ist daher im Gegensatz zu dem eines Normalbefunds keine Dreischichtung erkennbar. Das drüsenreiche Gewebe stellt sich hier zu Beginn als sehr signalstark dar und verliert mit zunehmender Tiefe an Signal, wodurch es dann dunkel erscheint. Das Licht dringt jedoch relativ weit ins Stroma ein.

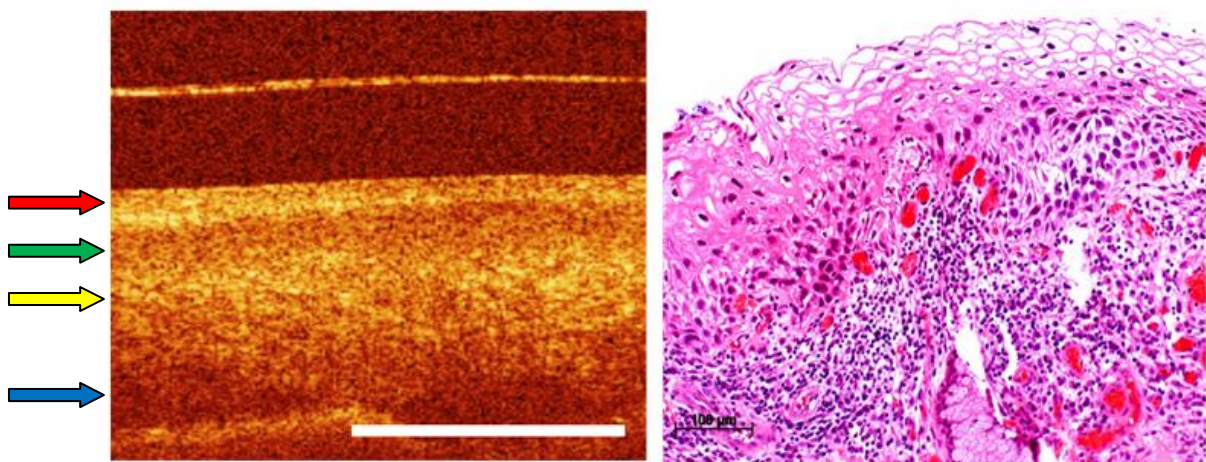


Abb. 20: OCT-Bild einer CIN 1 mit der dazu entsprechenden Histologie rechts.

Bei einer geringgradigen Läsion wie im Falle einer CIN 1 ist die Schichtung des Gewebes größtenteils noch vorhanden (Abb. 20). Sie entspricht derjenigen Schichtung, welche auch bei

einem Normalbefund zu beobachten ist (siehe Pfeile). Der einzige Unterschied zu einem Normalbefund ist die unscharfe Abgrenzung des Epithels zum Stroma, folglich des normalerweise der Basalmembran entsprechenden und des darüber liegenden Bereichs. Dies lässt sich anhand des histologischen Korrelats dazu erklären, da man hier eine Störung der Gewebearchitektur im basalen Epithelabschnitt beobachten kann.

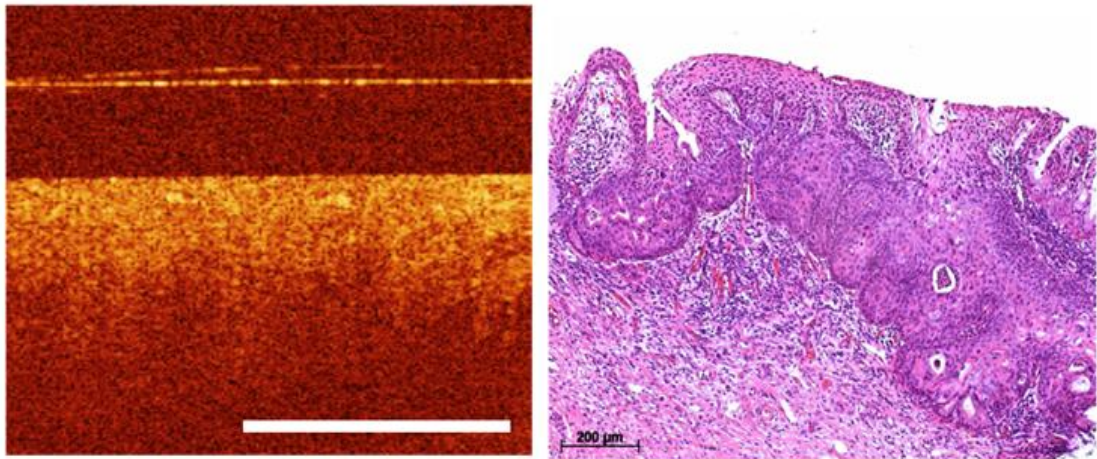


Abb. 21: OCT-Bild einer CIN 2 mit der dazu entsprechenden Histologie rechts.

Eine CIN 2 Läsion stellt sich in der OCT ohne eine erkennbare Schichtung dar (Abb. 21). Das Gewebe erscheint an der Oberfläche noch relativ signalstark und wird dann zunehmend signalschwächer. Die grenzbildende Basalmembran ist nicht auszumachen. Das Licht dringt bei einer CIN 2 im Gegensatz zu einem Normalbefund, einem CIN 1 Befund und zum Zylinderepithel, weniger tief ins Stroma ein, besitzt jedoch im Vergleich zu einer CIN 3 eine bessere Lichteindringtiefe. Histologisch ist eine Gewebearchitekturstörung bis zum mittleren Epitheldrittel erkennbar. Die CIN 2 stellt somit eine Zwischenstufe zwischen einer CIN 1 und einer CIN 3 dar.

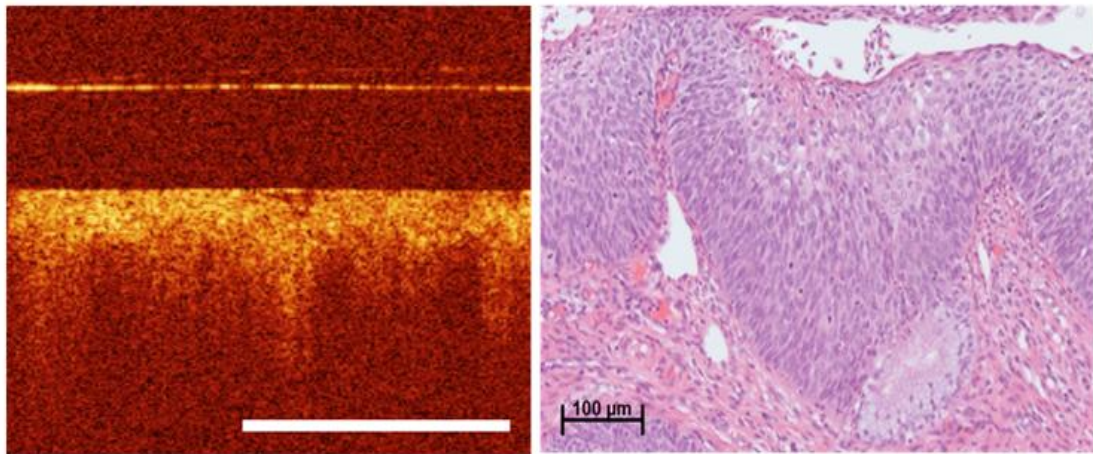


Abb. 22: OCT-Bild einer CIN 3 mit der dazu entsprechenden Histologie rechts.

In Abbildung 22 ist das OCT-Bild einer CIN 3 Läsion dargestellt. Wie bei einer CIN 2 sind auch hier sowohl die Epithelschichtung, als auch die Abgrenzung zwischen Epithel und Stroma nicht mehr erkennbar. Auf eine hellere stärker rückstreuende obere Schicht folgt unmittelbar ein rascher Helligkeitsabfall. Charakteristisch für eine CIN 3 sind die dunklen säulenartigen Formationen welche vertikal vom Stroma her Richtung Epithel vorzudringen scheinen.

4.2.1 Ergebnisse der Kontingenztabelle für Essigsäure, DMSO und PEG

In die folgende Analyse gingen 137 OCT-Bilder aus der Essigsäuregruppe, 202 OCT-Bilder aus der DMSO, sowie 232 OCT-Bilder aus der PEG-Gruppe mit ein. In Tabelle 12 ist exemplarisch die Kontingenztabelle für die Übereinstimmung zwischen den OCT-Befunden und der Histologie für die Essigsäuregruppe dargestellt. Die Diagnosen welche durch die Befundung der OCT-Bilder der mit Essigsäure behandelten Präparate getroffen wurden (Zeilenkategorien) sind in Tabelle 12 denjenigen der Histologie gegenübergestellt (Spaltenkategorien). Zur genaueren Untersuchung der Auswirkung der Essigsäure bezüglich der Diagnosefindung wurden die Bilder in drei Gruppen aufgeteilt, die „0 Minuten“-Gruppe, welche diejenigen OCT-Bilder umfasst welche vor Essigsäureapplikation aufgenommen wurden, die „3 Minuten“- sowie die „10 Minuten“-Gruppe. Bei DMSO/PEG betrug die Einwirkdauer hingegen 0, 5, 10 und 20 Minuten. Die rot markierten Zahlen in der Diagonalen der Tabelle entsprechen denjenigen Befunden in denen OCT und Histologie genau übereinstimmen. Die blau markierten Zahlen in der Tabelle stellen die durch die OCT überbefundeten, d.h. den gegenüber der histologischen Diagnose zu hoch eingestuft,

Befunde dar. Die grün markierten Zahlen in der Tabelle entsprechen den durch die OCT unterbefundeten, d.h. den gegenüber der histologischen Diagnose zu gering eingestuften, Befunden.

Histologie OCT	Einwirkdauer	Normalbefund	Inflammation	Zylinderepithel	CIN1	CIN2	CIN3	Gesamt
Normalbefund	0 Minuten	24	0	0	1	0	0	25
	3 Minuten	23	0	0	1	0	0	24
	10 Minuten	22	0	0	1	0	0	23
Inflammation	0 Minuten	0	2	0	0	0	0	2
	3 Minuten	1	3	0	0	0	0	4
	10 Minuten	1	1	0	0	0	0	2
Zylinderepithel	0 Minuten	0	0	4	0	0	0	4
	3 Minuten	0	0	4	0	0	0	4
	10 Minuten	0	0	4	0	0	0	4
CIN1	0 Minuten	0	2	0	1	0	0	3
	3 Minuten	0	1	0	1	0	0	2
	10 Minuten	0	3	0	1	0	0	4
CIN2	0 Minuten	0	2	0	0	1	1	4
	3 Minuten	0	2	0	0	1	2	5
	10 Minuten	0	2	0	0	1	1	4
CIN3	0 Minuten	0	0	0	0	0	8	8
	3 Minuten	0	0	0	0	0	7	7
	10 Minuten	0	0	0	0	0	8	8
Gesamt	0 Minuten	24	6	4	2	1	9	46
	3 Minuten	24	6	4	2	1	9	46
	10 Minuten	23	6	4	2	1	9	45

Tab. 12: Korrelation der Befunde zwischen OCT und Histologie vor und nach Essigsäureapplikation.

Betrachtet man die Gruppen einzeln so findet sich folgende Übereinstimmung zwischen OCT und Histologie: nach einer Einwirkzeit von 0 Minuten in 40 Fällen, nach 3 Minuten in 39 Fällen und nach 10 Minuten in 37 Fällen. Dies entspricht prozentual einer Gesamtübereinstimmung von jeweils 87 %, 85 % und 82 % in der Essigsäuregruppe. Analog dazu stimmten von den Diagnosen die anhand der OCT-Bilder nach 0, 5, 10 und 20 Minuten Einwirkdauer von DMSO gestellt wurden insgesamt jeweils 50 (98%), 48 (94%), 49 (96%) und 49 (96%) mit der Histologie überein, während in der PEG Gruppe die Gesamtübereinstimmung 0, 5, 10 und 20 Minuten nach Applikation des Agens jeweils 56 (97%), 57 (98%), 56 (97%) und 57 (98%) betrug.

4.2.2 Visuelle Beurteilung der Wirkung von Essigsäure auf die OCT

Aufgrund zu geringer Fallzahlen an CIN 1 und CIN 2 wurden in der Essigsäuregruppe die Befundgruppen Normalbefund, Inflammation und CIN 3 bei der Auswertung berücksichtigt. Anhand ausgewählter OCT-Bilder soll die von uns beobachtete Wirkung der Essigsäure sowie das Rating beispielhaft näher erläutert werden:

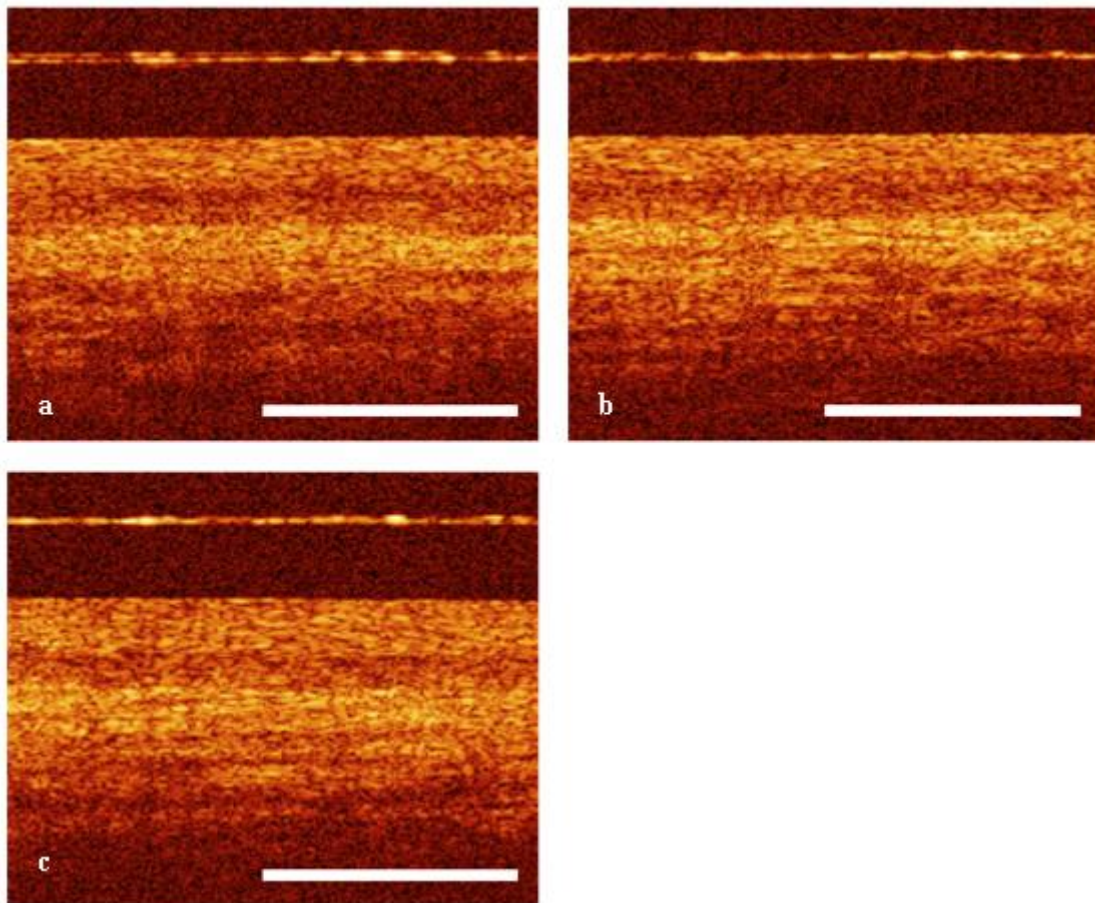


Abb. 23: OCT-Bilder eines Normalbefunds vor (a), sowie nach 3- (b) und 10-minütiger (c) Essigsäureapplikation.

Abbildung 23 zeigt drei OCT-Bilder eines Normalbefunds (mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel). Auf den ersten Blick scheinen sich die Bilder bezüglich der morphologischen Merkmale nicht zu unterscheiden. Auf allen drei Aufnahmen ist eine deutliche Dreischichtung des Gewebes zu erkennen. Betrachtet man die Aufnahmen nach Essigsäureeinwirkung und vergleicht sie mit derjenigen vor Essigsäureeinwirkung so gewinnt man den Eindruck einer progredienten Helligkeitszunahme, die sich mit zunehmender Einwirkzeit verstärkt und vor allem nach 10 Minuten deutlich zu sehen ist. Der Kontrast verschlechtert sich hingegen mit

zunehmender Einwirkzeit, was man vorwiegend an der verblassenden Intermediärzellschicht erkennt. Besonders nach 10-minütiger Einwirkzeit erscheint die der Basalmembran entsprechenden scharfen Grenze zwischen Epithel und Stroma sehr undeutlich. Das Stroma stellt sich vor allem zu Beginn als stark rückstreuende Schicht dar und erscheint, je tiefer das Licht ins Stroma eindringt, immer dunkler, da mehr Licht absorbiert und weniger zurückgestreut wird wodurch das Signal abnimmt. Auf den Aufnahmen nach Essigsäureapplikation gewinnt man den Eindruck einer leichten Tiefenzunahme nach 10 Minuten. Die Superficialzellschicht erscheint bei gleichbleibender Schichtdicke der Intermediärzellschicht und des Stromas nach 10-minütiger Essigsäureeinwirkung aufgequollen.

Dem Rating zufolge erhielten diese OCT-Bilder für die Kategorie Helligkeit nach 3 **(b)** und 10 **(c)** Minuten Essigsäureeinwirkung jeweils eine 3 **(b)** und 4 **(c)**, für die Kategorie Kontrast eine 3 **(b)** und 2 **(c)** sowie für die Kategorie Tiefe eine 3 **(b)** und 4 **(c)**.

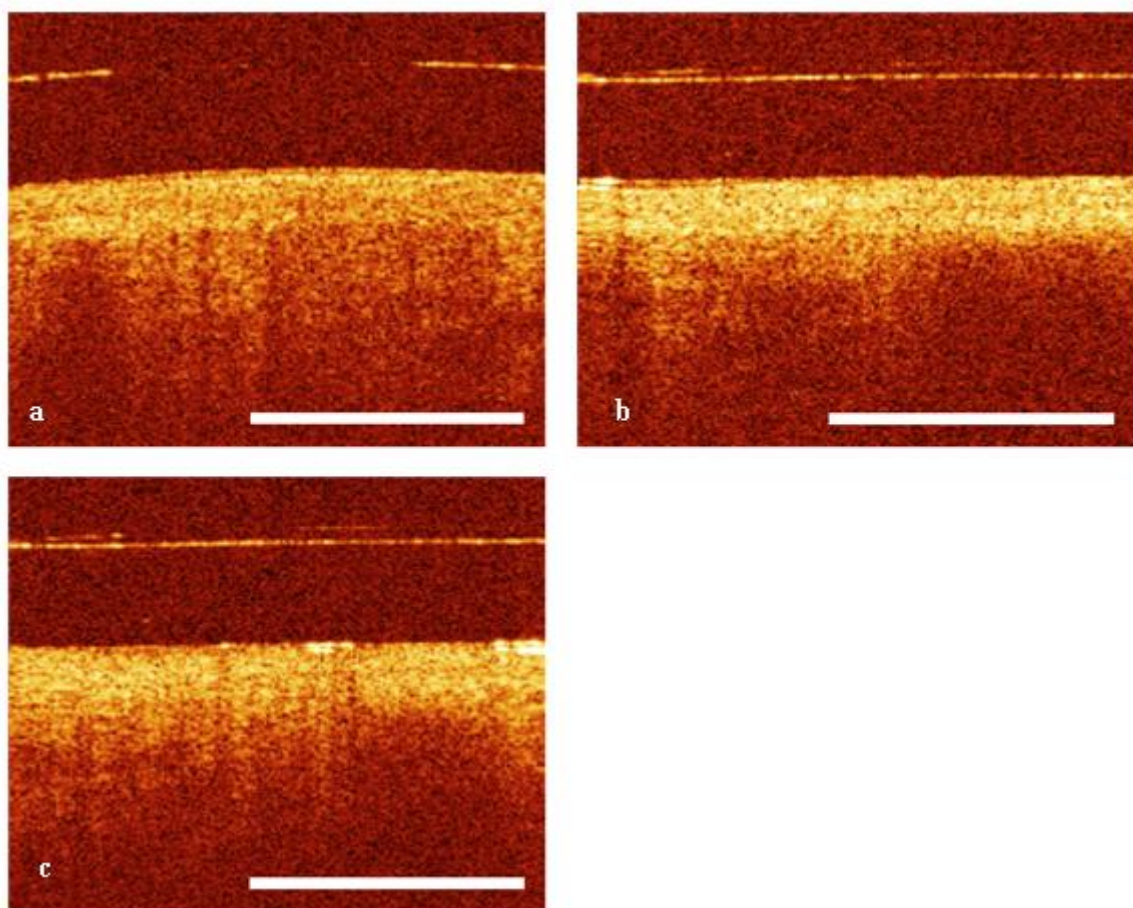


Abb. 24: OCT-Bilder einer Inflammation vor **(a)**, sowie nach 3- **(b)** und 10-minütiger **(c)** Essigsäureapplikation.

Bei den OCT-Bildern einer Inflammation (Abb. 24) kommt es durch die Essigsäureeinwirkung ebenfalls zu einer Helligkeitszunahme, während sich der Kontrast eher verschlechtert. Letzteres ist daran erkennbar, dass die Abgrenzung zwischen Epithel und Stroma undeutlicher wird. Die Tiefe scheint nach 3 Minuten Essigsäureeinwirkung abgenommen zu haben und ist nach 10 Minuten wieder mit der Tiefe des neutralen Bilds vergleichbar. Das Rating ergab nach 3 **(b)** und 10 Minuten **(c)** für die Kategorie Helligkeit eine 4 **(b)** und 4 **(c)**, für Kontrast eine 2 **(b)** und 2 **(c)** sowie für Tiefe eine 2 **(b)** und 3 **(c)**.

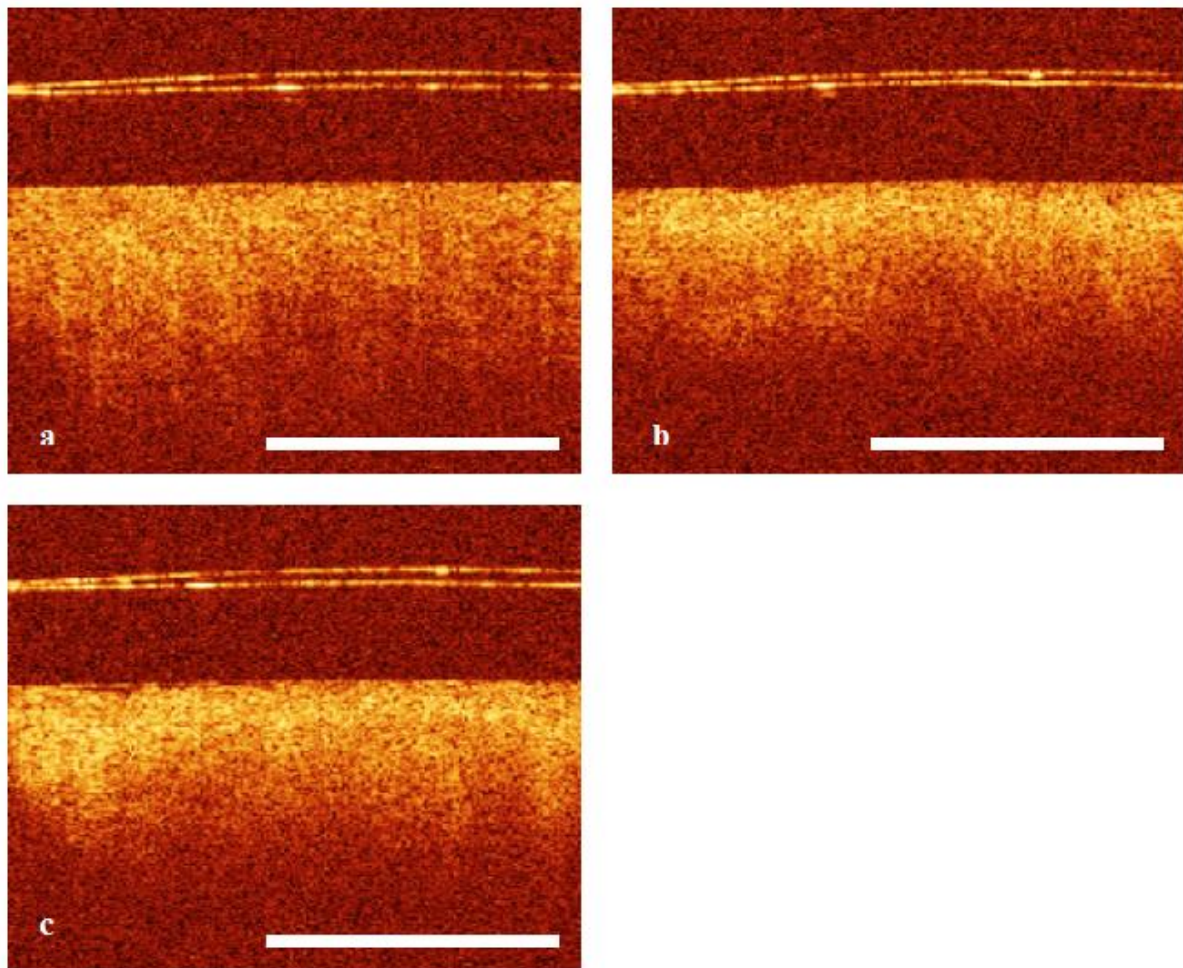
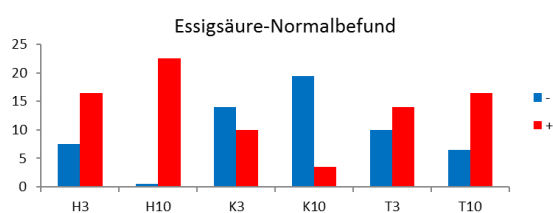


Abb. 25: OCT-Bilder einer CIN 3 vor **(a)**, sowie nach 3- **(b)** und 10-minütiger **(c)** Essigsäureapplikation.

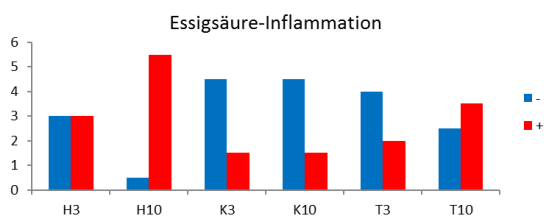
In Abbildung 25 sind die OCT-Bilder einer CIN 3 Läsion dargestellt. In allen drei Bildern ist sowohl die Epithelschichtung, als auch die Abgrenzung zwischen Epithel und Stroma nicht mehr erkennbar. Die Essigsäure führt auch hier zu einer Helligkeitszunahme, sie wurde in diesem Fall sowohl nach 3 Minuten **(b)** als auch nach 10 Minuten **(c)** mit dem Rating 4 bewertet. Der Kontrast wurde in **(b)** als 3 und in **(c)** als 4 empfunden, da die säulenartigen Formationen nach 10 Minuten geringfügig besser abgrenzbar sind, während das Signal im

Stroma deutlich abnimmt und die Aufnahme in der Tiefe gegenüber dem neutralen Bild undurchsichtiger erscheinen lässt. Das Rating ergab für die Tiefe sowohl für **(b)** als auch für **(c)** eine 2.

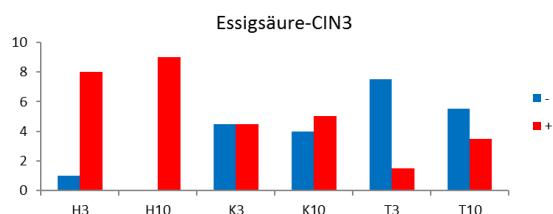
Einen Überblick über die Ratingvergabe aller OCT-Bilder aus der Essigsäuregruppe gibt Abbildung 26. Betrachtet man zunächst einmal alle Balkendiagramme, so fällt auf, dass sich die größten Unterschiede in der Kategorie Helligkeit ergaben, gefolgt von Kontrast und zuletzt der Kategorie Tiefe mit den geringsten Unterschieden.



Essigsäure-Norm.		Rating					n	Dichotom.		
Kat.	Dauer	1	2	3	4	5	Σ	-	+	p
H	3	0	1	13	10	0	24	7,5	16,5	.010
	10	0	0	1	15	7	23	0,5	22,5	.000
	Δ(3,10)									.012
K	3	0	10	8	6	0	24	14,0	10,0	.193
	10	6	13	1	2	1	23	19,5	3,5	.000
	Δ(3,10)									.046
T	3	0	3	14	7	0	24	10,0	14,0	.193
	10	0	1	11	9	2	23	6,5	16,5	.004
	Δ(3,10)									.256



Essigsäure-Infl.		Rating					n	Dichotom.		
Kat.	Dauer	1	2	3	4	5	Σ	-	+	p
H	3	0	3	0	3	0	6	3,0	3,0	.500
	10	0	0	1	5	0	6	0,5	5,5	.010
	Δ(3,10)									.170
K	3	0	4	1	1	0	6	4,5	1,5	.124
	10	0	4	1	1	0	6	4,5	1,5	.124
	Δ(3,10)									-
T	3	0	3	2	1	0	6	4,0	2,0	.282
	10	0	1	3	1	1	6	2,5	3,5	.500
	Δ(3,10)									.386



Essigsäure-CIN3		Rating					n	Dichotom.		
Kat.	Dauer	1	2	3	4	5	Σ	-	+	p
H	3	0	0	2	7	0	9	1,0	8,0	.002
	10	0	0	0	7	2	9	0,0	9,0	.000
	Δ(3,10)									.500
K	3	0	1	7	1	0	9	4,5	4,5	.500
	10	0	1	6	2	0	9	4,0	5,0	.500
	Δ(3,10)									.500
T	3	0	6	3	0	0	9	7,5	1,5	.009
	10	0	4	3	2	0	9	5,5	3,5	.319
	Δ(3,10)									.299

Abb. 26: Häufigkeitsverteilung der Rating-Urteile der OCT-Bilder in der Essigsäuregruppe für die Befundgruppen Normalbefund, Inflammation und CIN 3 (von oben nach unten). **Rechts:** Nach Dichotomisierung der Urteile (n) für die Kategorien (Kat.) Helligkeit (H), Kontrast (K) und Tiefe (T) in eine Abnahme- (-) und eine Zunahmegruppe (+), wurde jeweils der **p**-Wert für die Einwirkdauer von 3 und 10 Minuten berechnet. **Links:** Entsprechende Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Form von Barplots.

In der Gruppe der Normalbefunde wurden die OCT-Bilder nach Essigsäureeinwirkung gegenüber den Neutralaufnahmen als heller empfunden. Eine signifikante Helligkeitszunahme ergab sich in dieser Gruppe schon nach einer Einwirkdauer von 3 Minuten und verstärkte sich nochmals signifikant nach 10 Minuten ($\Delta (3,10)$). Der Kontrast verschlechterte sich durch die Essigsäureapplikation. Nach 10 Minuten zeigte sich dabei eine signifikante Verschlechterung sowohl gegenüber der Neutralaufnahme als auch gegenüber der Aufnahme nach 3-minütiger Essigsäureeinwirkdauer ($\Delta (3,10)$). Die Kategorie Tiefe wurde sowohl nach 3 als auch nach 10 Minuten häufiger mit einem Zunahme-Urteil bewertet. Eine Signifikanz ergab sich jedoch lediglich für das Rating nach 10-minütiger Einwirkdauer. Bei der Bewertung der Inflammations-Aufnahmen erwies sich die beobachtete Helligkeitsverbesserung nach 10 Minuten Essigsäureeinwirkdauer gegenüber der Neutralaufnahme als signifikant. Es zeigten sich jedoch keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich des Kontrasts und der Tiefe, wobei der Kontrast nach Essigsäureapplikation insgesamt tendenziell als schlechter eingestuft und die Tiefe nach 3 Minuten häufiger mit einem Abnahme- und nach 10 Minuten wiederum häufiger mit einem Zunahme-Urteil bewertet wurde. In der CIN 3 Gruppe ergab sich eine signifikante Verbesserung der Helligkeit gegenüber den Neutralaufnahmen, sowohl nach 3 als auch nach 10 Minuten. Bezüglich des Kontrasts ergab die Bewertung bei beinahe gleichverteilten Urteilen keinen signifikanten Effekt. Die Tiefe verschlechterte sich tendenziell, zeigte jedoch lediglich nach 3 Minuten Einwirkzeit eine Signifikanz.

4.2.3 Visuelle Beurteilung der Wirkung von DMSO auf die OCT

In der DMSO-Gruppe wurden bei der Auswertung die Normalbefunde, die CIN 2-, sowie die CIN 3-Befunde berücksichtigt. Die Wirkung von DMSO auf das Rating wird im Folgenden beispielhaft anhand der Abbildungen 27 bis 29 näher erläutert.

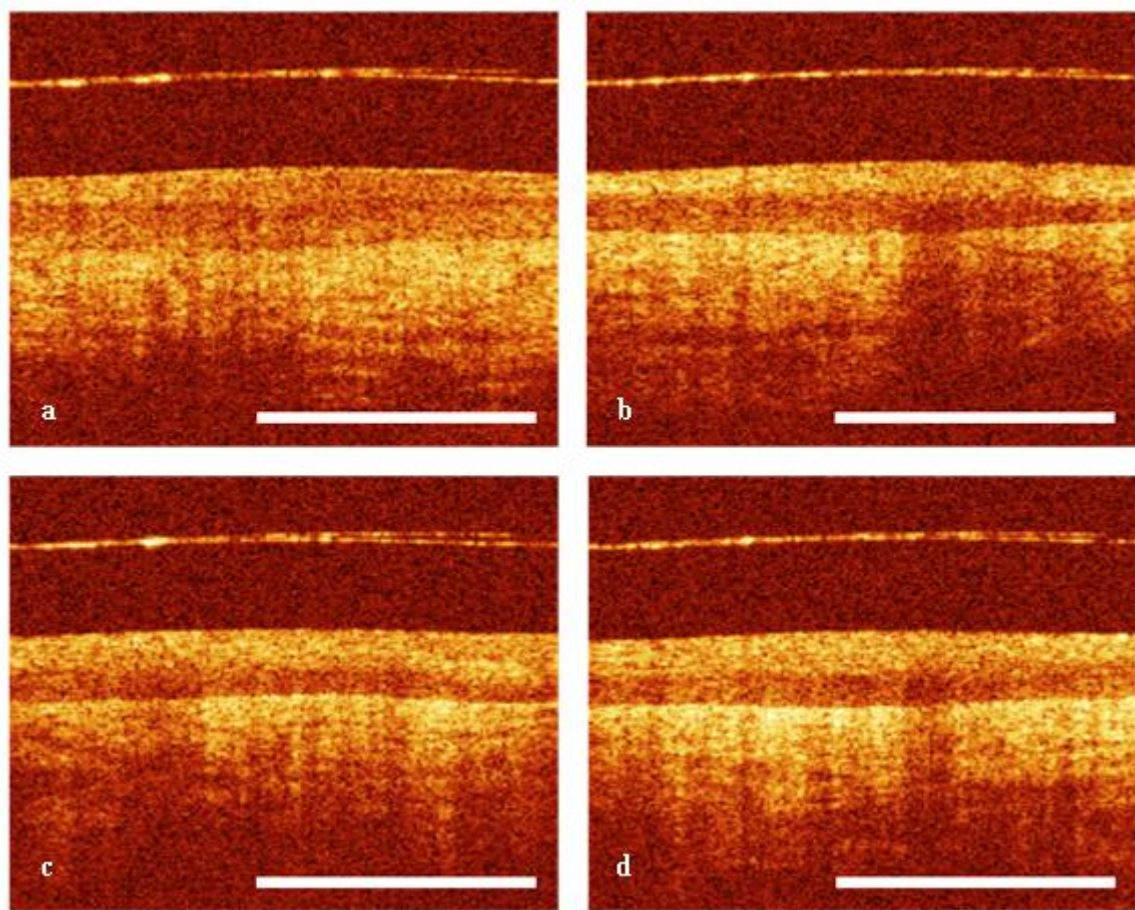


Abb. 27: OCT-Bilder eines Normalbefunds vor (a), sowie nach 5- (b), 10- (c) und 20-minütiger (d) Applikation von DMSO.

In Abbildung 27 wird das OCT-Bild eines Normalbefunds vor der Applikation von DMSO (a) mit den Bildern derselben Lokalisation nach der Behandlung des Präparats mit DMSO (b-d) verglichen. Analog zur Applikation von Essigsäure lassen sich auch hier keine größeren Unterschiede bezüglich der groben morphologischen Merkmale des hier aufgenommenen mehrschichtig unverhornten Plattenepithels nach der Applikation von DMSO erkennen. Die anhand der OCT gestellte Diagnose lieferte für alle vier Bilder einen Normalbefund. Es zeigte sich eine Helligkeitszunahme die bereits nach 5-minütiger Einwirkzeit von DMSO einsetzte. Diese Wirkung wird besonders durch den Vergleich der oberen Epithelschicht und des

Stromas zwischen **(a)** und **(b-d)** deutlich. Der Kontrast verstärkte sich ebenfalls bereits nach 5 Minuten, was an einer besseren Abgrenzung der verschiedenen Schichten auf den Bildern nach DMSO-Applikation gegenüber dem neutralen Bild deutlich wird. Auf die Lichteindringtiefe wirkt DMSO nach 20 Minuten in geringer Weise verbessernd.

Das Rating der OCT-Bilder aus Abbildung 27 ergab für die Helligkeit eine 4 **(b-d)**, für den Kontrast eine 4 **(b-d)** und für die Tiefe eine 3 **(b, c)** und 4 **(d)**.

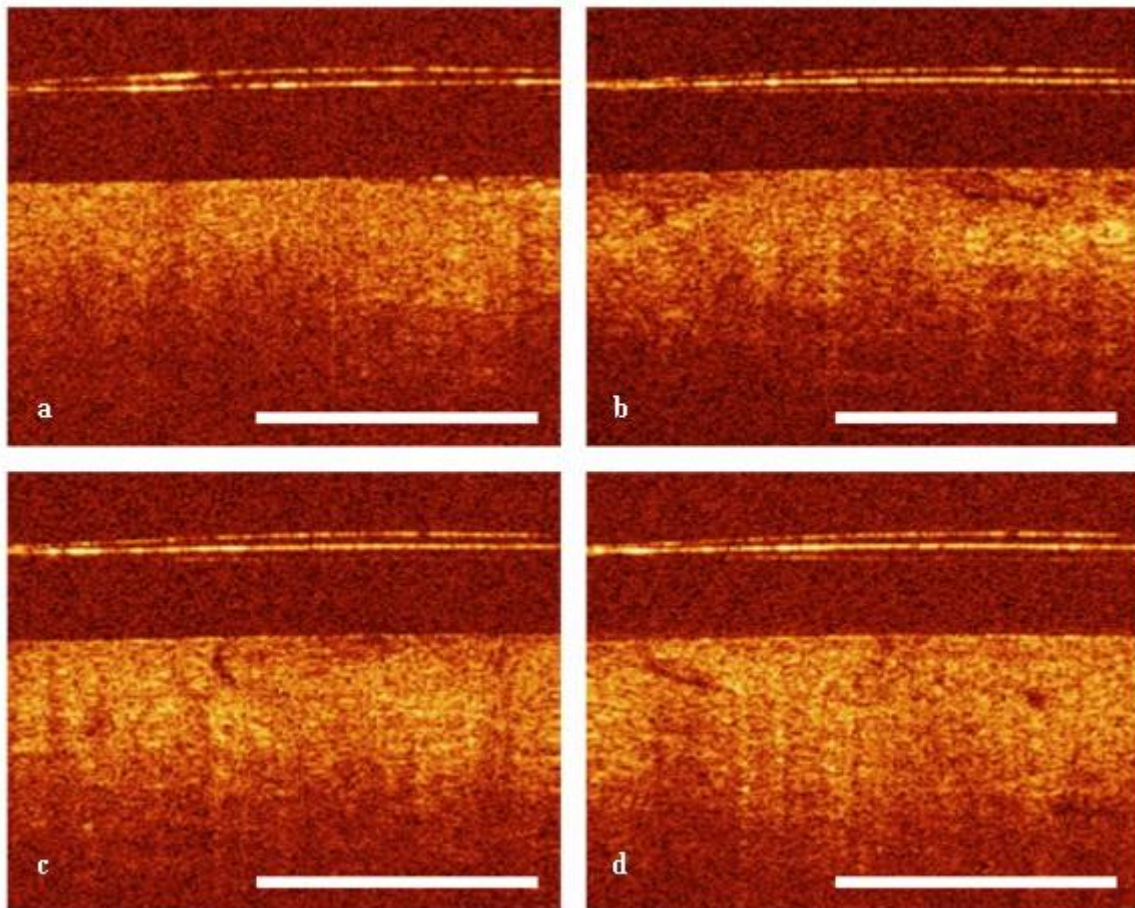


Abb. 28: OCT-Bilder einer CIN 2 vor **(a)**, sowie nach 5- **(b)**, 10- **(c)** und 20-minütiger **(d)** Applikation von DMSO.

Im Falle einer CIN 2 (Abb. 28) zeigt sich nach der Applikation von DMSO eine Zunahme an Helligkeit, welche bereits nach 5-minütiger Einwirkzeit einsetzt. Eine geringe Kontrastverstärkung zeigt sich nach 10 und 20 Minuten, ist jedoch bei nicht vorhandener Schichtung schwer beurteilbar. Das Licht scheint nach 10- und 20-minütiger DMSO-Applikation gegenüber dem neutralen und dem 5 Minuten Bild etwas tiefer einzudringen.

Das Rating der OCT-Bilder in Abbildung 28 ergab für die Helligkeit eine 4 (**b-d**), für den Kontrast eine 3 (**b**) und eine 4 (**c, d**) sowie für die Tiefe eine 3 (**b**) und eine 4 (**c, d**).

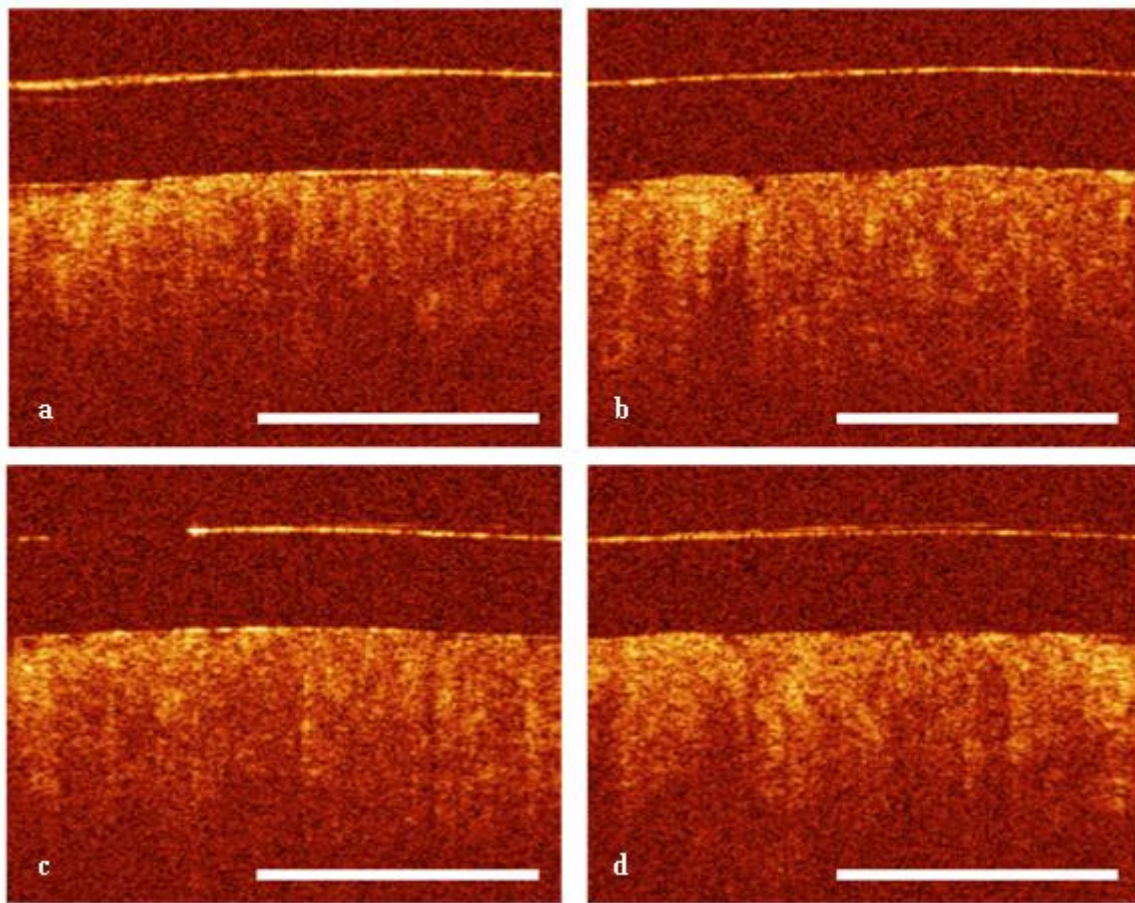
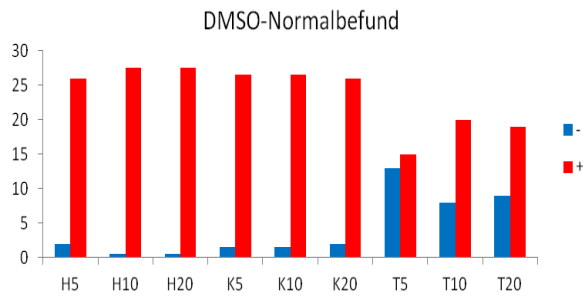


Abb. 29: OCT-Bilder einer CIN 3 vor (**a**), sowie nach 5- (**b**), 10- (**c**) und 20-minütiger (**d**) Applikation von DMSO.

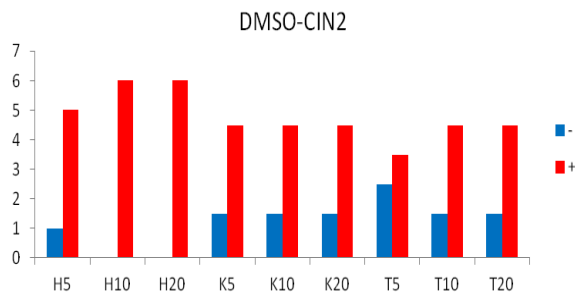
Die OCT-Bilder in Abbildung 29 zeigen eine CIN 3 Läsion. Auffallend ist eine Helligkeitszunahme die sich mit zunehmender Einwirkzeit verstärkt und nach 20 Minuten am deutlichsten erscheint. Der Kontrast verstärkt sich erst nach 10-minütiger Einwirkzeit, was sich an einer besseren Abgrenzung der säulenartigen Formationen zeigt. Das Stroma ist bereits ab einer Einwirkzeit von 5 Minuten tiefer einsehbar. Die Tiefe verbessert sich mit zunehmender Einwirkzeit jedoch vernachlässigbar gering.

Das Rating ergab für obige OCT-Bilder für die Helligkeit eine 4 (**b, c**) und eine 5 (**d**), für den Kontrast eine 3 (**b**) und eine 4 (**c,d**) sowie für die Tiefe eine 4 (**b-d**).

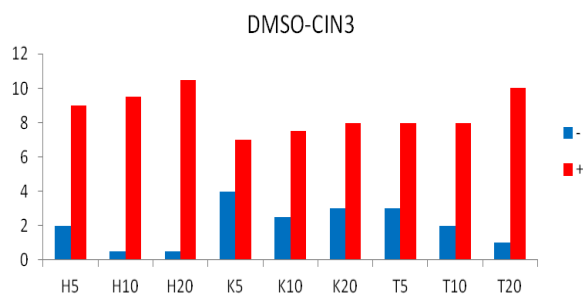
Einen Überblick über die Ratingvergabe aller OCT-Bilder aus der DMSO-Gruppe gibt Abbildung 30.



DMSO-normal		Rating						Dichotom.		
Kat.	Dauer	1	2	3	4	5	Σ	-	+	p
H	5	0	0	4	24	0	28	2,0	26,0	.000
	10	0	0	1	19	8	28	0,5	27,5	.000
	20	0	0	1	11	16	28	0,5	27,5	.000
K	5	0	0	3	25	0	28	1,5	26,5	.000
	10	0	1	1	18	8	28	1,5	26,5	.000
	20	0	1	2	13	12	28	2,0	26,0	.000
T	5	0	3	20	5	0	28	13,0	15,0	.395
	10	0	3	10	13	2	28	8,0	20,0	.002
	20	0	3	12	9	4	28	9,0	19,0	.008



DMSO-CIN2		Rating						Dichotom.		
Kat.	Dauer	1	2	3	4	5	Σ	-	+	p
H	5	0	0	2	4	0	6	1,0	5,0	.041
	10	0	0	0	6	0	6	0,0	6,0	.002
	20	0	0	0	3	3	6	0,0	6,0	.002
K	5	0	0	3	3	0	6	1,5	4,5	.124
	10	0	1	1	3	1	6	1,5	4,5	.124
	20	0	1	1	3	1	6	1,5	4,5	.124
T	5	0	0	5	1	0	6	2,5	3,5	.500
	10	0	1	1	4	0	6	1,5	4,5	.124
	20	0	1	1	3	1	6	1,5	4,5	.124



DMSO-CIN3		Rating						Dichotom.		
Kat.	Dauer	1	2	3	4	5	Σ	-	+	p
H	5	0	0	4	7	0	11	2,0	9,0	.005
	10	0	0	1	8	1	10	0,5	9,5	.000
	20	0	0	1	6	4	11	0,5	10,5	.000
K	5	0	0	8	3	0	11	4,0	7,0	.197
	10	0	0	5	5	0	10	2,5	7,5	.037
	20	0	0	6	5	0	11	3,0	8,0	.044
T	5	0	0	6	5	0	11	3,0	8,0	.044
	10	0	0	4	6	0	10	2,0	8,0	.013
	20	0	0	2	8	1	11	1,0	10,0	.000

Abb. 30: Häufigkeitsverteilung der Rating-Urteile der OCT-Bilder in der DMSO-Gruppe für die Befundgruppen der Normalbefunde, CIN 2 und CIN 3 (von oben nach unten). **Rechts:** Nach Dichotomisierung der Urteile (n) für die Kategorien (Kat.) Helligkeit (H), Kontrast (K) und Tiefe (T) in eine Abnahme- (-) und eine Zunahmegruppe (+), wurde jeweils der *p*-Wert für die Einwirkdauer von 5, 10 und 20 Minuten berechnet. **Links:** Entsprechende Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Form von Barplots

Das Rating der OCT-Bilder der Normalbefunde ergab eine bereits nach 5 Minuten beginnende signifikante Helligkeitszunahme, welche mit zunehmender Einwirkdauer von DMSO relativ konstant blieb. Analog dazu verhielt es sich mit dem Kontrast, während eine signifikante Verbesserung der Tiefe lediglich ab einer Einwirkdauer von 10 Minuten beobachtet werden konnte.

Für die als CIN 2 befundeten OCT-Bilder ergab die Auswertung des Ratings ebenfalls eine von der Einwirkdauer unabhängige signifikante Helligkeitszunahme, die bereits nach 5 Minuten einsetzte. Der Kontrast wurde zwar nach der Applikation von DMSO gegenüber den Aufnahmen des unbehandelten Gewebes stets als verbessert gewertet, die Statistik zeigte in diesen Fällen jedoch keine Signifikanz. Die Tiefe wurde tendenziell häufiger, wenn auch nicht signifikant, mit einem Zunahme-Urteil bewertet. In der Gruppe der CIN 3-Befunde zeigte sich eine signifikante Helligkeitsverbesserung die bereits nach 5-minütiger Einwirkdauer einsetzte und nach weiteren 5, bzw. 15 Minuten nur geringfügig zunahm. Eine signifikante Verbesserung des Kontrasts zeigte sich erst ab einer Einwirkdauer von 10 Minuten. Die Tiefe verbesserte sich signifikant, unabhängig von der Einwirkdauer, bereits 5 Minuten nach Applikation von DMSO.

4.2.4 Visuelle Beurteilung der Wirkung von PEG auf die OCT

Die statistische Auswertung der OCT-Bilder, die von den mit PEG behandelten Präparaten gewonnen wurden, umfasst die Befundgruppen der Normalbefunde, sowie der Inflammationen und CIN 3.

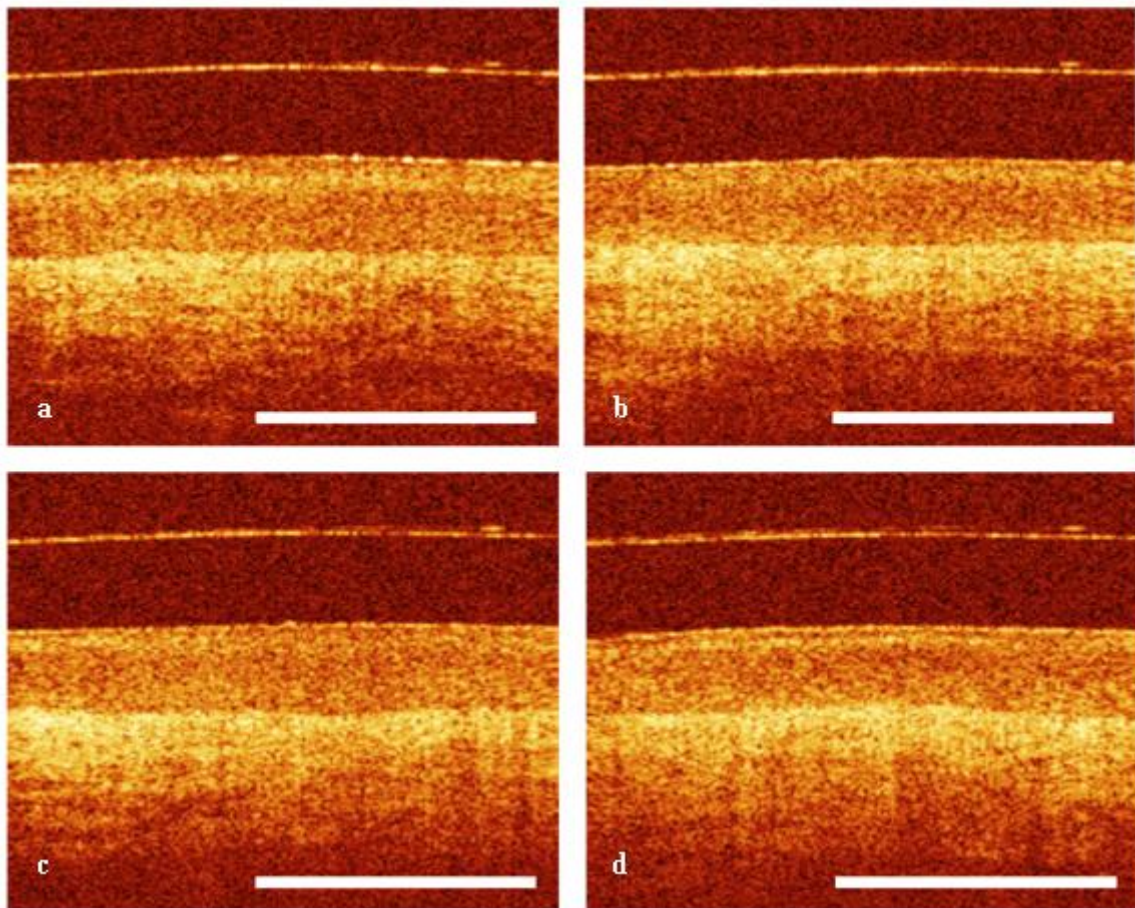


Abb. 31: OCT-Bilder eines Normalbefunds vor (a), sowie nach 5- (b), 10- (c) und 20-minütiger (d) Applikation von PEG.

Bei der Betrachtung der OCT-Bilder in Abbildung 31 zeigt sich eine Zunahme an Helligkeit, welche nach 5 Minuten einsetzt und unabhängig von der Einwirkzeit ist. Der Kontrast scheint sich im obigen Beispiel nach 5- und 10-minütiger Einwirkzeit von PEG etwas zu verschlechtern, da die oberste Epithelschicht gegenüber dem neutralen Bild weniger deutlich abgrenzbar ist. Dagegen ist nach 20 Minuten eine deutliche Kontrastverbesserung zu erkennen. Die Lichteindringtiefe verbessert sich nach 10 und 20 Minuten gering, während die Schichtdicke nach Applikation von PEG keine Veränderungen gegenüber dem neutralen OCT-Bild zeigt.

Das Rating ergab für die Helligkeit eine 4 (**b-d**), für den Kontrast eine 2 (**b, c**) und eine 4 (**d**), sowie für die Tiefe eine 3 (**b**) und eine 4 (**c, d**).

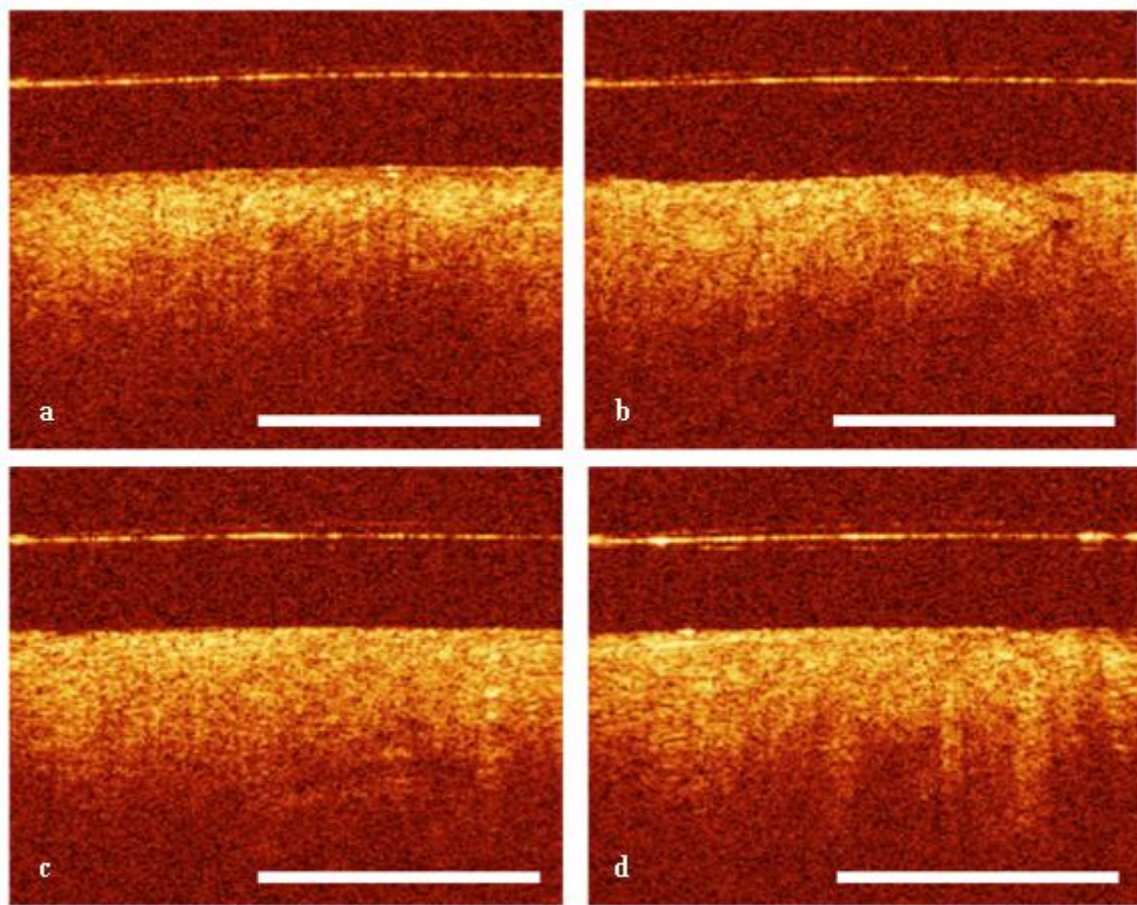


Abb. 32: OCT-Bilder einer Inflammation vor (**a**), sowie nach 5- (**b**), 10- (**c**) und 20-minütiger Applikation von PEG.

Die Behandlung mit PEG führt im ohnehin stärker rückstreuenden entzündeten Gewebe zu einer weiteren Zunahme an Helligkeit die ab einer Einwirkzeit von 10 Minuten deutlich erkennbar wird (Abb. 32). Der Kontrast und die Tiefe verbessern sich ab einer Einwirkzeit von 10 Minuten gering.

Die Helligkeit und der Kontrast wurden beide mit einer 3 (**b**) und 4 (**c, d**), die Tiefe mit einer 3 (**b**), 4 (**c**) und 5 (**d**) bewertet.

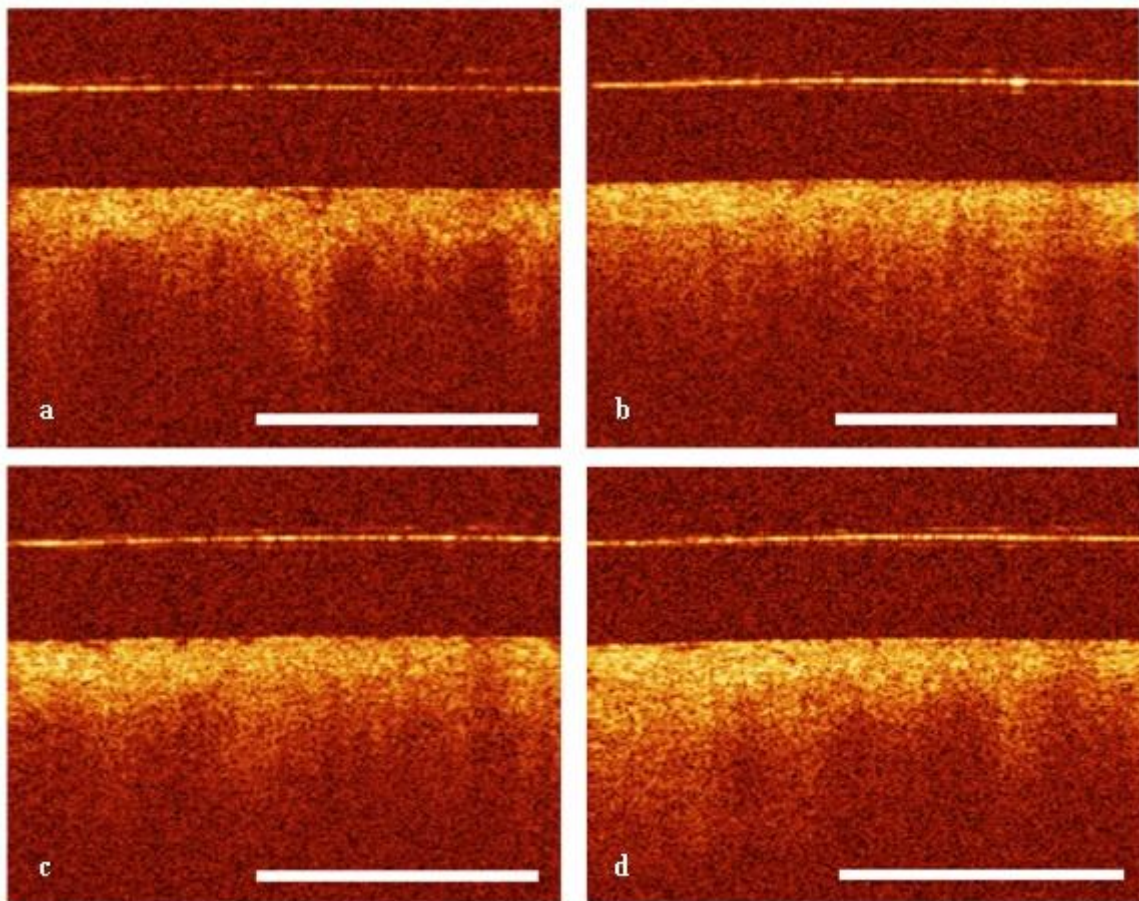
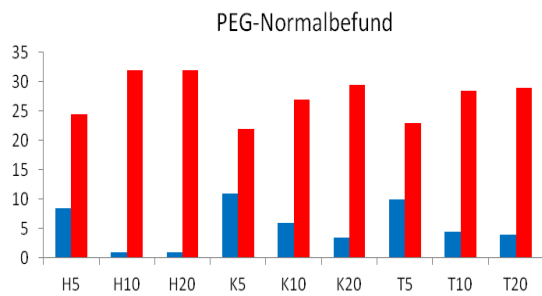


Abb. 33: OCT-Bilder einer CIN 3 vor (a), sowie nach 5- (b), 10- (c) und 20-minütiger (d) Applikation von PEG.

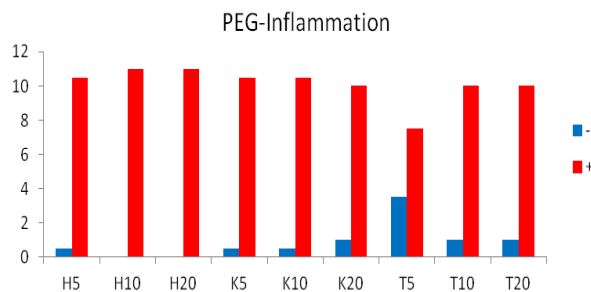
Die OCT-Bilder einer CIN 3 Läsion (Abb. 33) zeigen eine progrediente Helligkeitszunahme ab einer Einwirkzeit von 5 Minuten und eine von der Einwirkzeit unabhängige Kontrastverbesserung. Die Tiefe zeigt erst nach 10-minütiger PEG-Applikation eine leichte Verbesserung.

Das Rating ergab für die Helligkeit eine 4 (b) und eine 5 (c, d), für den Kontrast eine 4 (b-d) sowie für die Tiefe eine 3 (b) und eine 4 (c, d).

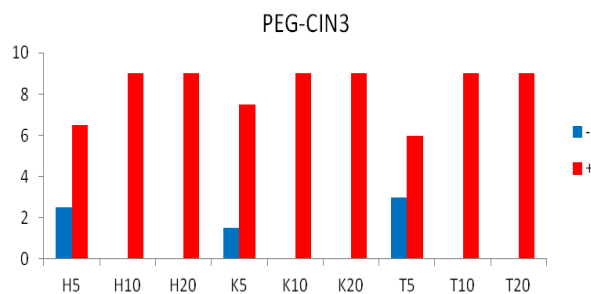
Die Abbildung 34 gibt einen Überblick über die Ratingvergabe aller OCT-Bilder aus der PEG-Gruppe.



PEG-normal		Rating						Dichotom.		
Kat.	Dauer	1	2	3	4	5	Σ	-	+	p
H	5	0	1	15	17	0	33	8,5	24,5	.000
	10	0	0	2	21	10	33	1,0	32,0	.000
	20	0	0	2	12	19	33	1,0	32,0	.000
K	5	0	8	6	18	1	33	11,0	22,0	.007
	10	1	2	6	16	8	33	6,0	27,0	.000
	20	1	1	3	17	11	33	3,5	29,5	.000
T	5	0	2	16	15	0	33	10,0	23,0	.002
	10	0	0	9	19	5	33	4,5	28,5	.000
	20	0	0	8	18	7	33	4,0	29,0	.000



PEG-Inflamm.		Rating						Dichotom.		
Kat.	Dauer	1	2	3	4	5	Σ	-	+	p
H	5	0	0	1	10	0	11	0,5	10,5	.000
	10	0	0	0	4	7	11	0,0	11,0	.000
	20	0	0	0	2	9	11	0,0	11,0	.000
K	5	0	0	1	10	0	11	0,5	10,5	.000
	10	0	0	1	8	2	11	0,5	10,5	.000
	20	0	0	2	7	2	11	1,0	10,0	.000
T	5	0	1	5	5	0	11	3,5	7,5	.100
	10	0	0	2	9	0	11	1,0	10,0	.000
	20	0	0	2	6	3	11	1,0	10,0	.000



PEG-CIN3		Rating						Dichotom.		
Kat.	Dauer	1	2	3	4	5	Σ	-	+	p
H	5	0	0	5	4	0	9	2,5	6,5	.079
	10	0	0	0	8	1	9	0,0	9,0	.000
	20	0	0	0	6	3	9	0,0	9,0	.000
K	5	0	0	3	6	0	9	1,5	7,5	.009
	10	0	0	0	9	0	9	0,0	9,0	.000
	20	0	0	0	9	0	9	0,0	9,0	.000
T	5	0	0	6	2	1	9	3,0	6,0	.173
	10	0	0	0	9	0	9	0,0	9,0	.000
	20	0	0	0	3	6	9	0,0	9,0	.000

Abb. 34: Häufigkeitsverteilung der Rating-Urteile der OCT-Bilder in der PEG-Gruppe für die Befundgruppen der Normalbefunde, Inflammation und CIN 3 (von oben nach unten). **Rechts:** Nach Dichotomisierung der Urteile (n) für die Kategorien (Kat.) Helligkeit (H), Kontrast (K) und Tiefe (T) in eine Abnahme- (-) und eine Zunahmegruppe (+), wurde jeweils der *p*-Wert für die Einwirkdauer von 5, 10 und 20 Minuten berechnet. **Links:** Entsprechende Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Form von Barplots

Aus ihr geht hervor, dass es in der Gruppe der Normalbefunde zu einer signifikanten Verbesserung aller drei Kategorien, Helligkeit, Kontrast und Tiefe kam. Der Effekt war bereits nach einer Einwirkdauer von 5 Minuten ausgeprägt und verstärkte sich geringfügig mit zunehmender Einwirkzeit. Ein analoger Effekt konnte auch in der Inflammations- sowie in der CIN 3-Gruppe für alle drei Kategorien beobachtet werden, mit Ausnahme der Tiefe in beiden Befundgruppen, sowie der Helligkeit in der CIN 3-Gruppe, die erst ab einer 10-minütigen Einwirkdauer als signifikant besser beurteilt wurde.

4.3 Quantitative Bildanalyse

Der vorausgegangenen qualitativen Bildanalyse folgte eine quantitative durch die Erstellung von mittleren Helligkeitsprofilen sowie den zugehörigen mittleren Differenzprofilen. Es wurden insgesamt 506 Einzelprofile erstellt, von denen 315 der Gruppe der Normalbefunde, 62 der Gruppe der Inflammationen, 24 der Gruppe der CIN 2 und 105 der Gruppe der CIN 3 angehörten. Aufgrund zu geringer Fallzahlen konnten die Helligkeitsprofile der CIN 1 Gruppe nicht statistisch ausgewertet werden. Die OCT-Bilder von Zylinderepithel wurden ebenfalls von der quantitativen Auswertung ausgeschlossen, da die Helligkeitsprofile aufgrund der Drüsen einen zu heterogenen Verlauf aufwiesen und ihre Auswertung somit keinen Sinn machte. Wie bereits erwähnt befand sich kein Fall eines Karzinoms in den von uns untersuchten Präparaten. Die mittleren Helligkeitsprofile ergaben sich wie bereits im Material und Methoden Teil beschrieben durch Mittelung der Einzelprofile über die Fälle pro Befundgruppe für die jeweilige Einwirkzeit des untersuchten Agens, und die mittleren Differenzprofile wiederum aus den entsprechenden mittleren Helligkeitsprofilen. Die Einteilung in die Befundgruppen erfolgte dabei anhand der Histologie. Allgemein lässt sich aus dem Verlauf der Helligkeitsprofile erkennen was für eine Läsion durch die OCT-Bilder erfasst wurde. Diesbezüglich wurden die Ergebnisse vorausgegangener Studien bestätigt [135, 136]. In den Abbildungen 35 bis 40 soll der befundabhängige Verlauf anhand von Einzelprofilen veranschaulicht werden. Dieser ist für alle Befunde, bis auf die des Zylinderepithels, trotz der inter- sowie intraindividuellen Gewebsunterschiede der Patientinnen relativ homogen und somit zuverlässig reproduzierbar. Auf die Darstellung eines repräsentativen Helligkeitsprofils von Zylinderepithel wird aus dem oben genannten Grund an dieser Stelle verzichtet.

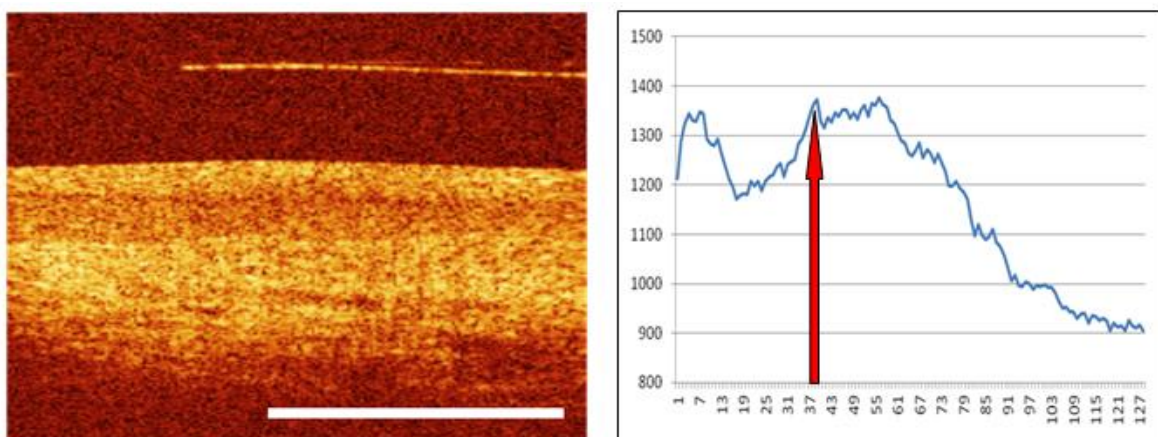


Abb. 35: OCT-Bild eines Normalbefunds (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).

Im Falle eines Normalbefunds ergibt sich aufgrund der Dreischichtung des Gewebes charakteristischerweise ein zweigipfliges Helligkeitsprofil (Abb. 35). Der erste Gipfel ist durch die signalstärkere Superficialzellschicht bedingt und reicht im obigen Beispiel von Image point 0 (entspricht dem Gewebebeginn) bis ca. zum Image point 19. Der signalärmere Bereich zwischen den zwei Gipfeln entspricht der Intermediärzellschicht. Das Maximum des zweiten Gipfels (roter Pfeil), welcher sich ca. beim Image point 40 befindet, entspricht der Reflexion an der Grenze des Epithels zum Stroma, folglich der Basalmembran. Der nachfolgende Abschnitt des Helligkeitsprofils entspricht dem Stroma welches zu Beginn signalstärker als die Superficialzellschicht ist und mit zunehmender Tiefe an Helligkeit verliert. Der minimale Helligkeitswert beträgt bei allen Profilen 900.

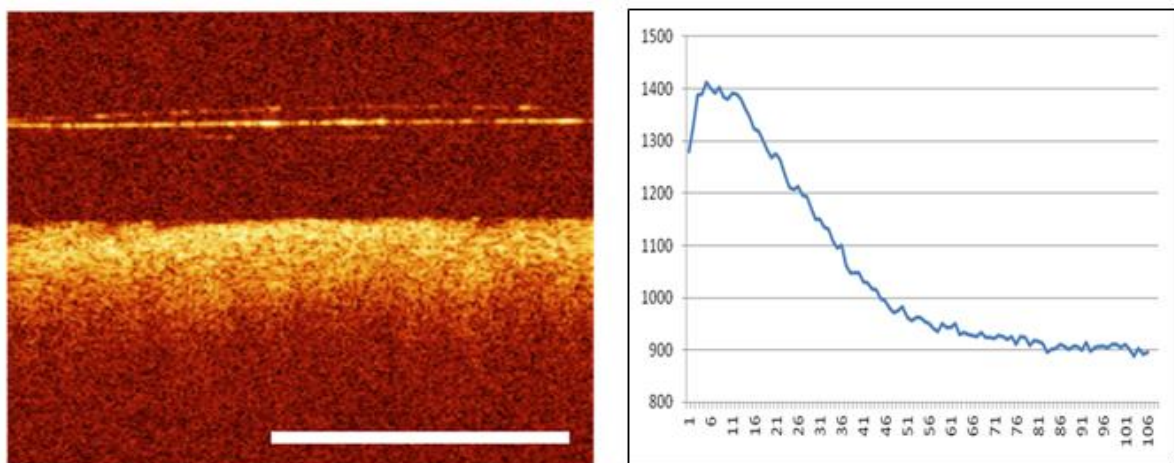


Abb. 36: OCT-Bild einer Inflammation (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).

Der charakteristische Profilverlauf einer Inflammation zeigt sehr hohe Helligkeitswerte zu Gewebebeginn, in diesem Fall um die 1400, und eine anschließende schlagartige Helligkeitsabnahme im Stroma (Abb. 36). Diese bedingt den im Vergleich zu den Profilen aller anderen Befunde sehr steil abfallenden Profilverlauf (Abb. 40).

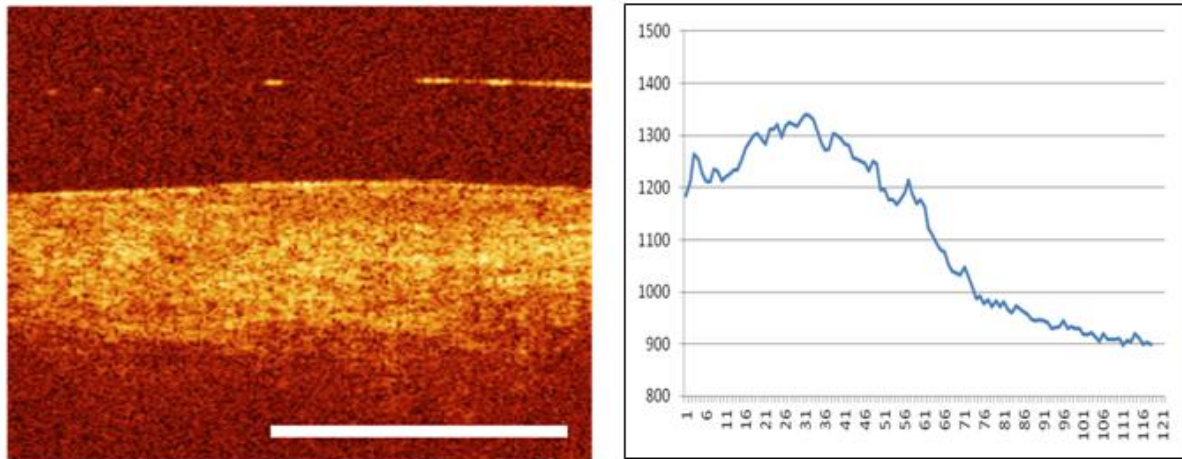


Abb. 37: OCT-Bild einer CIN 1 (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).

Auf dem Helligkeitsprofil eines CIN 1 Befunds ist der zweigipflige Verlauf zwar noch angedeutet, er ist jedoch nicht mehr so eindeutig erkennbar wie im Falle eines Normalbefunds (Abb. 37). Besonders der zweite Gipfel stellt sich im Vergleich zu dem eines Normalbefunds verbreitert und ohne ein eindeutiges Maximum dar. Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass in der OCT bei einer CIN 1 der Bereich um die Basalmembran nicht mehr scharf dargestellt werden kann. Im Stroma dringt das Licht bei einer CIN 1 noch relativ weit ein, weswegen die Signalintensität im Gegensatz zur CIN 2-3 dort höher ist (Abb. 40).

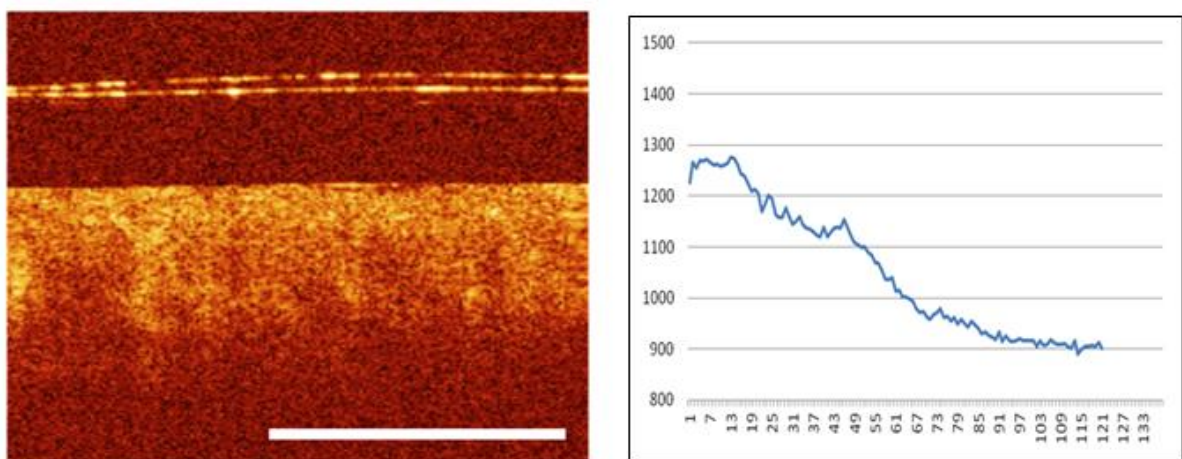


Abb. 38: OCT-Bild einer CIN 2 (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).

Das Helligkeitsprofil eines CIN 2 Befunds zeigt aufgrund der fehlenden Schichtung in der OCT lediglich einen Gipfel zu Beginn mit einem, im Vergleich zur Inflammation, eher flachen Profilabfall, was auf eine weniger abrupte Helligkeitsabnahme im Stroma zurückzuführen ist

(Abb. 38). Das Licht dringt bei einer CIN 2 im Vergleich zu einer CIN 1 weniger tief und im Vergleich zur einer CIN 3 tiefer ein. Deswegen ist hier im Vergleich zur CIN 1 ein steilerer und im Vergleich zur CIN 3 ein flacherer Profilabfall zu beobachten (Abb. 40).

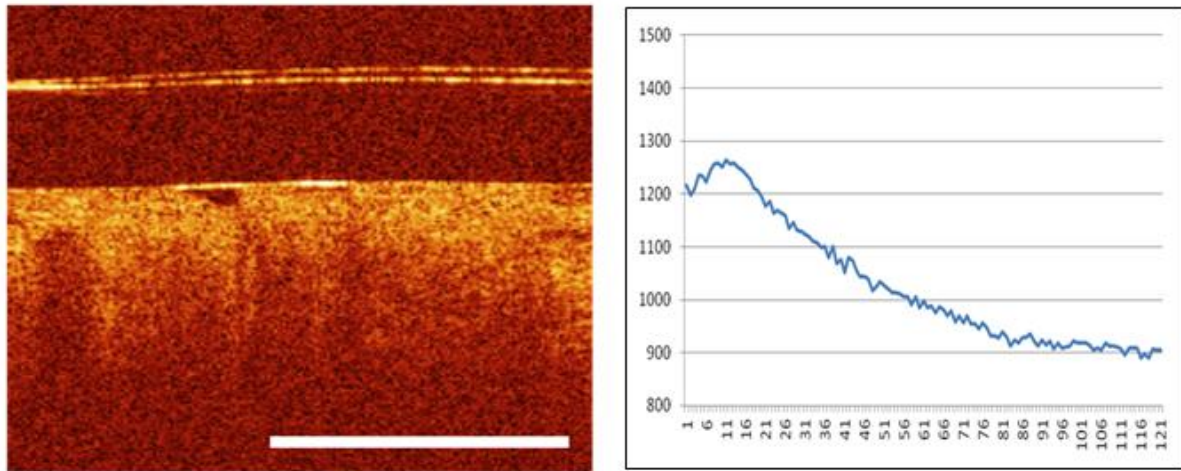


Abb. 39: OCT-Bild einer CIN 3 (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).

Für einen CIN 3 Befund ergibt sich ähnlich wie im Falle einer CIN 2 ein eingipfliger Verlauf und anschließend ein etwas steilerer Profilabfall (Abb. 39), der durch die frühere und stärkere Helligkeitsabnahme im Stroma, bzw. durch die dunklen säulenartigen Formationen welche fast bis an die Epitheloberfläche reichen, bedingt ist. In Abbildung 40 sind alle Helligkeitsprofile zur Zusammenfassung nochmals übereinander dargestellt, wobei aus Übersichtsgründen jeweils die Profile der gesunden/benigen sowie die der prämaligen Befunde in einer separaten Grafik zusammengefasst wurden.

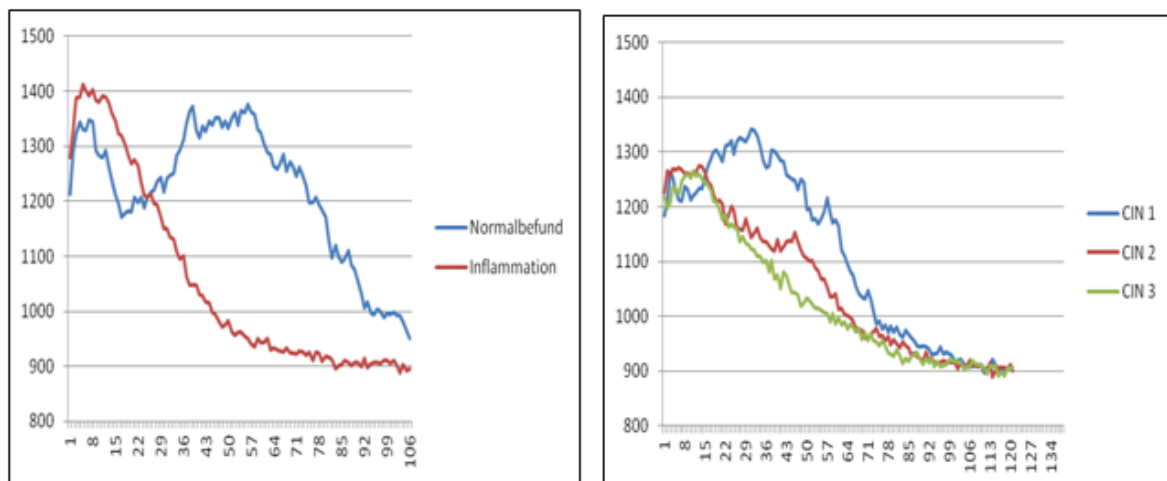


Abb. 40: Helligkeitsprofile eines Normalbefunds und einer Inflammation (links), sowie einer CIN 1-3 (rechts).

Durch die quantitative Analyse konnte verifiziert werden ob die visuellen Eindrücke bezüglich der Wirkung der Essigsäure sowie der Clearingmittel DMSO und PEG über die verschiedenen Einwirkzeiten auch tatsächlich vorhanden waren und quantifizierbar sind, oder ob sie lediglich vom Beobachter durch Zufall als solche empfunden wurden. Anhand der Profile lässt sich die Wirkung auf die Helligkeit direkt quantifizieren. Die Wirkung auf den Kontrast sowie auf die Tiefe geht nur indirekt aus dem Profilverlauf hervor und ist daher im Gegensatz zur Helligkeit schwer quantifizierbar. Die mittleren Helligkeitsprofile sowie die zugehörigen mittleren Differenzprofile wurden in einheitlicher Weise für alle drei Agens-Gruppen in Grafiken abgebildet. Links findet man immer die mittleren Helligkeitsprofile für eine Befundgruppe. Die abgebildeten Befundgruppen variieren je nach Agens, wobei die Gruppen der Normalbefunde und der CIN 3 bei allen drei Agens-Gruppen repräsentiert sind. Die einzelnen Grafiken der mittleren Helligkeitsprofile bestehen wiederum aus drei bis vier Profilen, da diese getrennt nach der jeweiligen Bedingung (neutral, 3/10 bzw. 5/10/20 Minuten Einwirkzeit) dargestellt sind. Rechts neben den mittleren Helligkeitsprofilen findet man immer das zugehörige mittlere Differenzprofil, welches ebenfalls aus drei bis sechs einzelnen Profilen besteht. Diese entsprechen jeweils den Differenzen zwischen einer Einwirkzeit (d steht für die Dauer, engl. „duration“) und der neutralen Bedingung n vor Agens-Applikation (dx-n), sowie den Differenzen der verschiedenen Einwirkzeiten unter sich (dx-dy). Bei den mittleren Differenzprofilen handelt es sich um geglättete Profile, sog. „spline approximations“, welche lediglich den Hauptverlauf der mittleren Differenzprofile wiedergeben sollen.

4.3.1 Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile nach Essigsäure-Applikation

Insgesamt gingen in die Erstellung der mittleren Helligkeitsprofile der Essigsäuregruppe 116 Einzelprofile ein. 71 davon waren der Gruppe der Normalbefunde zuzuordnen, während jeweils 18 und 27 Fälle unter die Gruppe der Inflammationen und CIN 3 fielen. In den Abbildungen 42 bis 44 sind die mittleren Helligkeitsprofile der Normalbefunde, Inflammationen sowie der CIN 3 Befunde jeweils für die „neutrale“ Bedingung sowie für 3 Minuten und 10 Minuten Essigsäureeinwirkzeit abgebildet. Rechts neben den mittleren Helligkeitsprofilen finden sich die zugehörigen mittleren Differenzprofile welche den Differenzen des 3 Minuten minus „neutral“ Profils (d3-n), des 10 Minuten minus „neutral“ Profils (d10-n) sowie des 10 Minuten minus 3 Minuten Profils (d10-d3) entsprechen. Der

Tabelle 13 sind die Ergebnisse des KPSS-Tests für die mittleren Differenzprofile zu entnehmen.

Befundgruppe	Mittlere Differenzen	Trend	p-Wert
Normalbefund	d3-n	0.266	0.01
	d10-n	0.282	0.01
	d10-d3	0.595	0.01
Inflammation	d3-n	0.238	0.01
	d10-n	0.185	0.02
	d10-d3	0.269	0.01
CIN 3	d3-n	0.794	0.01
	d10-n	0.447	0.01
	d10-d3	0.279	0.01

Tab. 13: Ergebnisse des KPSS-Tests für die mittleren Differenzprofile der Essigsäuregruppe.

Die Trendwerte stehen für das Ausmaß mit welchem das jeweilige mittlere Differenzprofil von einem um die Nulllinie fluktuierenden Profil („0“-Profil) abweicht. Je größer der Trend desto stärker weicht auch das jeweiligen Profil von einem „0“-Profil ab. Dabei prüft der KPSS-Test die Hypothese der Existenz eines Trends und weniger auf lokale Abweichungen eines mittleren Differenzprofils von 0. Dies erklärt auch wieso sich für manche mittlere Differenzprofile ein kleinerer Trendwert ergibt, obwohl sie abschnittsweise sehr stark von einem „0“-Profil abweichen. Ein schwächeres Abweichen vom „0“-Profil über den gesamten Verlauf des mittleren Differenzprofils wird folglich als größerer Trend wahrgenommen, als eine starke Abweichung lediglich in kurzen Profilabschnitten. In Abbildung 41 soll dies beispielhaft anhand der Helligkeitswerte für die Profile der Gruppe der Normalbefunde (Abb. 42) illustriert werden. In den Grafiken wurden die Helligkeitswerte der beiden mittleren Helligkeitsprofile, welche miteinander verglichen werden sollten, gegeneinander aufgetragen. In Abbildung 41 sind von links nach rechts die Profilplots für (d3-n), (d10-n) sowie (d10-d3) dargestellt (Ordinate-Abszisse). Würden sich die zwei gegeneinander aufgetragenen Profile nicht systematisch voneinander unterscheiden, so müsste die durch die Punktelwolke gelegte Regressionsgerade eine Steigung nahe 1 und eine additive Konstante nahe 0 aufweisen (entsprechend der roten Geraden, Abb. 41). Betrachtet man die mittleren Differenzprofile für die Normalbefunde (Abb. 42) so würde man evtl. erwarten, dass sich der größte Trend für das blaue Profil (d10-n), gefolgt von dem schwarzen (d3-n) und zuletzt dem roten Profil (d10-d3) ergibt. Stattdessen weist das (d10-d3)-Profil mit 0.595 den größten Trendwert auf, gefolgt von (d10-n) mit 0.282 und (d3-n) mit 0.266 (Tab. 13, Normalbefund). Wie bereits beschrieben, werden vom KPSS-Test lokale Abweichungen vom „0“-Profil, selbst wenn sie sehr groß sind, nicht unbedingt als Trend detektiert. Sowohl das (d3-n)- sowie das (d10-n)-Profil weisen

jedoch vorwiegend im Bereich der niedrigen Image points, in welchen auch die hohen Helligkeitswerte repräsentiert sind, Abweichungen vom „0“-Profil auf, die mit zunehmender Zahl der Image points geringer werden. Dies ist sowohl an den mittleren Helligkeitsprofilen, die sich mit zunehmender Image point Zahl an das „neutrale“ Profil, sowie an den mittleren Differenzprofilen, welche sich entsprechend an ein „0“-Profil annähern ersichtlich. Die Helligkeitswerte korrelieren mit den Image points, da man im OCT-Bild die hohen Helligkeitswerte im oberen und die niedrigen Helligkeitswerte eher im unteren Bildbereich findet. Die Häufung von Abweichungen im Bereich der hohen Helligkeitswerte (Abb. 41, (d3-n)-Profil und (d10-n)-Profil rechte obere Ecke) wird vom KPSS-Test als ein kleinerer Trend wahrgenommen, im Vergleich zu einer konstanten, wenn auch nicht sehr großen Abweichung der Punkte von der roten Geraden über alle Image points bzw. Helligkeitswerte (Abb. 41, (d10-d3)-Profil).

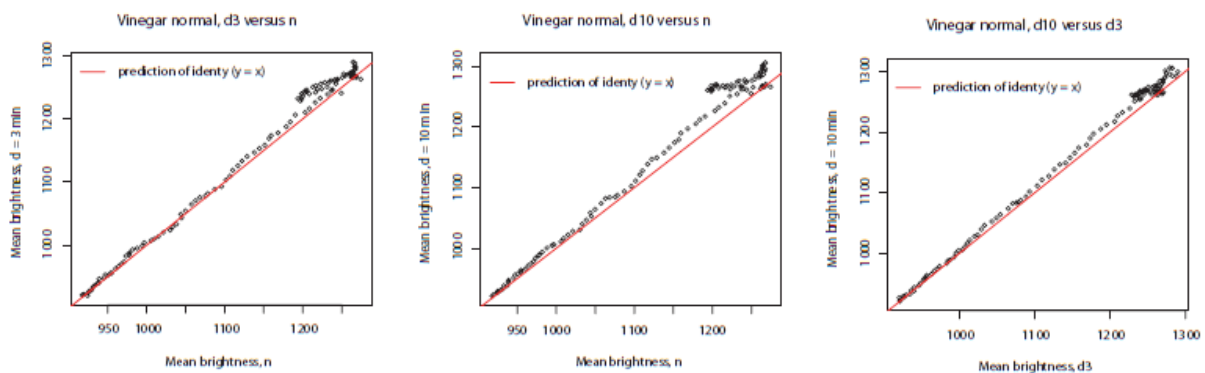


Abb. 41: Profilplots der Helligkeitswerte der mittleren Helligkeitsprofile von links nach rechts für die „neutral“ Bedingung auf der Abszisse, gegen die 3 Minuten und 10 Minuten Essigsäureeinwirkzeit auf der Ordinate, sowie ganz rechts der 3 Minuten (Abszisse) gegen die 10 Minuten Essigsäureeinwirkzeit (Ordinate).

Für jeden Trendwert ist ein p -Wert angegeben (Tab. 13). Dabei handelt es sich nicht um die eigentlichen, sondern vielmehr um obere Grenzwerte der eigentlichen p -Werte. Diese sind alle kleiner als 0.05, weswegen die Nullhypothese in allen hier vorliegenden Fällen abgelehnt werden kann, da alle mittleren Differenzprofile signifikant von einem „0“-Profil abweichen. Der Effekt der untersuchten Agenzien ist bei allen Befundgruppen vor allem im oberen OCT-Bildbereich, in welchem sich auch das Epithel befindet, zu beobachten. Im Bereich des Stromas hingegen zeigt sich kein sehr großer Effekt. Aus diesem Grund weichen die mittleren Differenzprofile vor allem vom Image point 0 bis 40 stark von einem „0“-Profil ab. Das

Vorliegen eines signifikanten Trends ist für unsere Fragestellung folglich von großer Bedeutung, während die Größe des Trendwerts eher vernachlässigt werden kann.

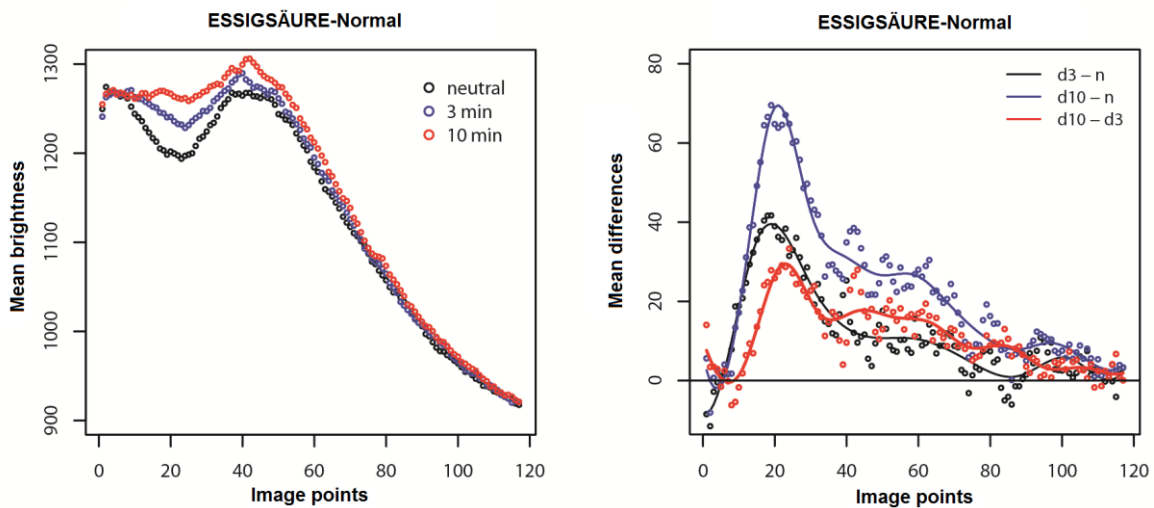


Abb. 42: Mittlere Helligkeitsprofile der Normalbefunde vor (neutral) sowie nach 3 und 10 Minuten Essigsäureeinwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.

Bei der Betrachtung der mittleren Helligkeitsprofile der Gruppe der Normalbefunde, wird ein mit der Einwirkzeit zunehmender positiver Effekt auf die Helligkeit deutlich. Dieser ist auf den mittleren Helligkeitsprofilen in etwa über die ersten 50 bis 60 Image points deutlich sichtbar. Wie aus Abbildung 42 ersichtlich wird weichen die mittleren Differenzkurven deutlich von einem um die Nulllinie fluktuierenden Profil ab und zeigen damit, dass Unterschiede zwischen den mittleren Helligkeitsprofilen der unterschiedlichen Bedingungen bestehen. Für das (d3-n)- sowie für das (d10-n)-Profil sind bis auf die ersten Image points alle Werte positiv. Dies deutet auf eine Helligkeitszunahme bereits nach 3 Minuten Essigsäureeinwirkzeit und einer noch stärkeren Ausprägung des Effekts nach einer Gesamteinwirkzeit von 10 Minuten über die gesamte Gewebedicke hin. Diese beiden mittleren Differenzprofile verlaufen ca. bis Image point 15 aufeinander wonach das (d10-n)- über dem (d3-n)-Profil verläuft und somit den stärkeren Effekt durch die längere Gesamteinwirkzeit verdeutlicht. Das mittlere Differenzprofil (d10-d3) verläuft bis auf die ersten 10 Image points ebenso ausschließlich im positiven Bereich, was nochmals auf die Zunahme des Effekts mit länger werdender Einwirkzeit hinweist.

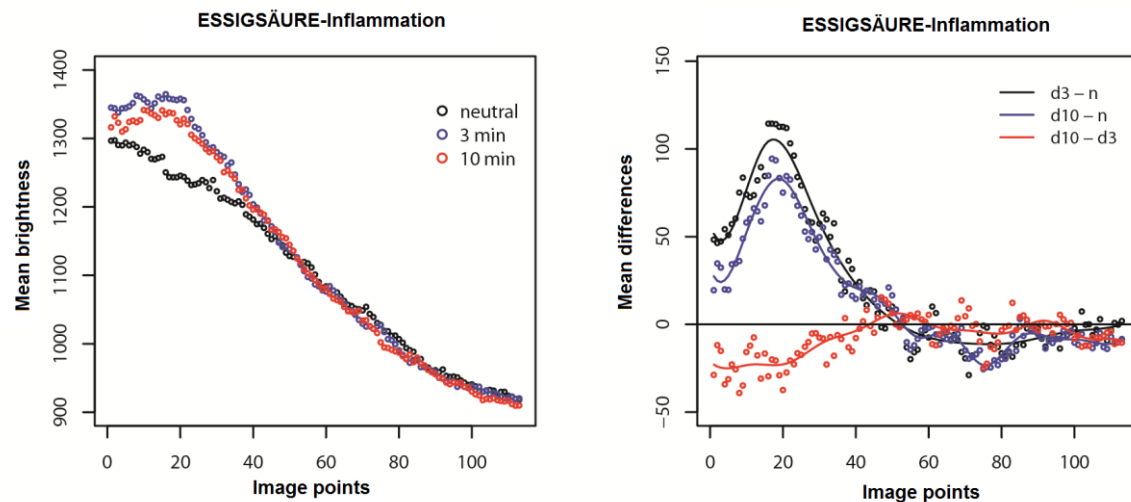


Abb. 43: Mittlere Helligkeitsprofile der Inflammationen vor (neutral) sowie nach 3 und 10 Minuten Essigsäureeinwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.

Die mittleren Helligkeitsprofile der Befundgruppe der Inflammationen (Abb. 43) ähneln denjenigen der CIN 3. Durch die Applikation der Essigsäure kommt es ab Gewebebeginn bis zum Image point von etwa 50 zu einer Helligkeitszunahme, welche bereits nach 3 Minuten vollends ausgeprägt ist und nach 10 Minuten geringfügig abnimmt. Dies spiegelt sich in den mittleren Differenzprofilen deutlich wieder. Ab dem Image point 0 (entspricht dem Gewebebeginn) bis zum Image point von 40 bis 50 verläuft das (d3-n)-Profil oberhalb des (d10-n)-Profils, wonach sie mehr oder weniger aufeinander und ab dem Image point von 50 beide leicht unterhalb der Nulllinie verlaufen. Das (d10-d3)-Profil verläuft dementsprechend für die ersten 40 Image points unterhalb der Nulllinie und zeigt im weiteren Verlauf keine großen Unterschiede zu den beiden anderen Profilen.

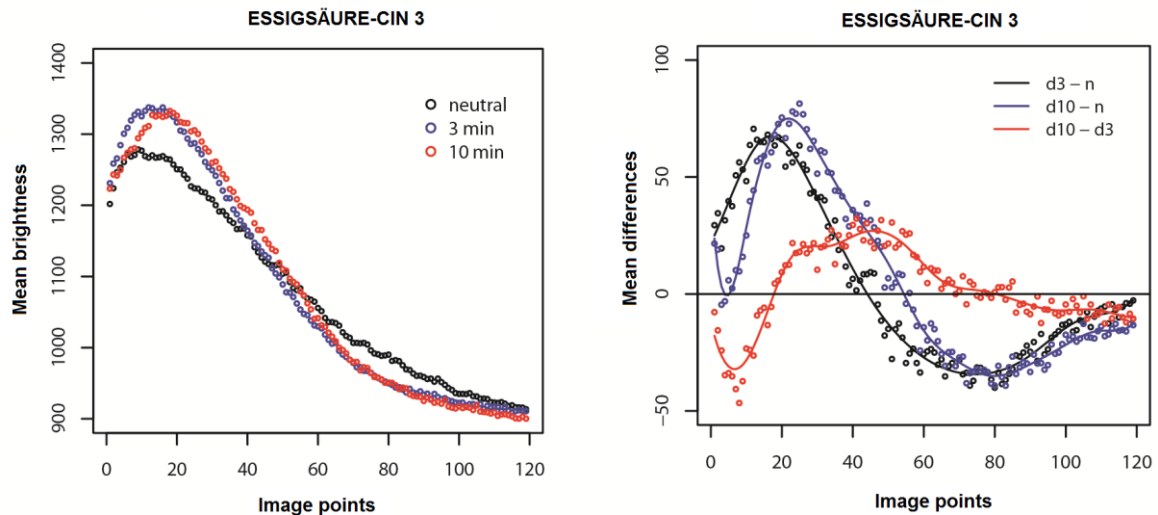


Abb. 44: Mittlere Helligkeitsprofile der CIN 3 Befunde vor (neutral) sowie nach 3 und 10 Minuten Essigsäureeinwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.

Die mittleren Helligkeitsprofile der CIN 3 Befunde liefern im Gegensatz zu den Profilen der Normalbefunde ein anderes Bild (Abb. 44). Es zeigt sich direkt zu Gewebebeginn eine starke Helligkeitszunahme die bereits nach 3 Minuten vollends ausgeprägt zu sein scheint. Das (d10-n)-Profil verläuft ca. bis Image point 20 unterhalb des (d3-n)-Profils, es scheint folglich in diesem Bereich zu einer leichten Helligkeitsabnahme nach 10 Minuten gegenüber 3 Minuten Essigsäureeinwirkzeit zu kommen. Ab dem Image point von ca. 20, was ungefähr der Epithelmitte entspricht, bis zu dem Image point von ca. 80 erscheint das Gewebe unter der längeren Einwirkzeit heller als unter der kürzeren. Die kürzere Einwirkzeit von 3 Minuten bewirkt also eine stärkere Helligkeitszunahme an der Epitheloberfläche, während durch die längere Einwirkzeit von 10 Minuten die Helligkeit erst ab Epithelmitte zuzunehmen scheint. In beiden Fällen kommt es durch die Essigsäureeinwirkung ca. ab Image point von 40 bis 50 beginnend zu einer deutlichen Helligkeitsabnahme gegenüber dem „neutralen“ Gewebe vor Essigsäureeinwirkung. Die mittleren Helligkeitsprofile für 3 Minuten sowie für 10 Minuten Essigsäureeinwirkung unterkreuzen in diesem Bereich das „neutral“ Profil. Aus dem nebenstehenden mittleren Differenzprofil ist herauszulesen, dass dieser Effekt der Helligkeitsabnahme für die Einwirkzeit von 3 Minuten bereits oberflächlicher während er bei 10 Minuten Einwirkzeit erst tiefer auftritt. Das (d3-n)-Profil unterkreuzt die Nulllinie ca. ab Image point 45 während dies beim (d10-n)-Profil ca. ab Image point 50 der Fall ist. Das mittlere Differenzprofil (d10-d3) spiegelt das bereits gesagte wieder, da es zwischen dem Image point 20 bis 80 oberhalb der Nulllinie und in den übrigen Bereichen unterhalb der Nulllinie verläuft.

Für die Versuchsgruppe der Essigsäure lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Beobachtungen der qualitativen Bildanalyse durch die quantitative Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile bestätigt werden konnten.

4.3.2 Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile nach DMSO-Applikation

Insgesamt gingen in die Erstellung der mittleren Helligkeitsprofile der DMSO-Gruppe 178 Einzelprofile ein. 112 davon waren der Gruppe der Normalbefunde zuzuordnen, während 24 und 42 Fälle unter die Gruppe der CIN 2 und CIN 3 fielen. In den Abbildungen 45 bis 47 sind die mittleren Helligkeitsprofile der Normalbefunde, CIN 2 und CIN 3 Befunde jeweils für die „neutrale“ Bedingung (vor DMSO-Applikation) sowie für die DMSO-Einwirkdauer von 5, 10 und 20 Minuten abgebildet. Rechts neben den mittleren Helligkeitsprofilen finden sich die zugehörigen mittleren Differenzprofile, welche den Differenzen der Profile zu den verschiedenen Einwirkzeiten und der „neutralen“ Profile (d5-n, d10-n, d20-n) sowie den Differenzen der Profile der verschiedenen Einwirkzeiten untereinander (d10-d5, d20-d5, d20-d10) entsprechen. Der Tabelle 14 sind die p -Werte des Hotelling's T2 Tests, sowie des ADF-Tests für die jeweiligen mittleren Differenzprofile zu entnehmen. An dieser Stelle sei nochmal darauf hingewiesen, dass ein großer p -Wert ($p > 0.05$) beim ADF-Test die Zurückweisung unserer Nullhypothese bedeutet. Der Runs-Test lieferte konstant signifikante Werte ($p = 0.000$) für alle geprüften mittleren Differenzprofile, weswegen aus Übersichtsgründen auf eine Darstellung dieser in Tabelle 14 verzichtet wurde. Der Test zeigt, dass es sich bei den Trends in den mittleren Differenzprofilen nicht um zufällige Folgen von Image points handelt.

Befundgruppe	Mittlere Differenzen	p -Wert (Hot)	p -Wert (ADF)
Normalbefund	d5-n	0.000	0.490
	d10-n	0.000	0.636
	d20-n	0.000	0.787
	d10-d5	0.000	0.971
	d20-d5	0.000	0.980
	d20-d10	0.816	0.959
CIN 2	d5-n	0.000	0.278
	d10-n	0.000	0.514
	d20-n	0.000	0.264
	d10-d5	0.000	0.192
	d20-d5	0.722	0.445
CIN 3	d20-d10	0.000	0.364
	d5-n	0.000	0.846
	d10-n	0.000	0.612
	d20-n	0.000	0.854
	d10-d5	0.000	0.775
	d20-d5	0.000	0.503
	d20-d10	0.000	0.988

Tab. 14: p -Werte des Hotelling's T2- Tests (Hot) und Augmented Dickey-Fuller-Tests (ADF) für DMSO.

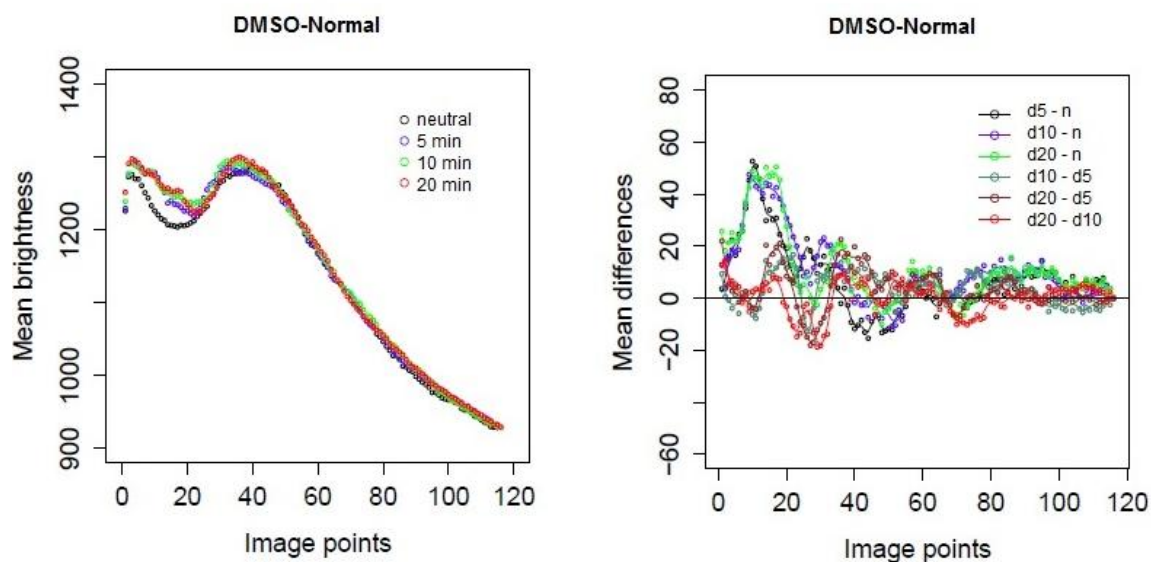


Abb. 45: Mittlere Helligkeitsprofile der Normalbefunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten DMSO-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.

Die Testung der mittleren Differenzprofile für die Normalbefunde ergab einen signifikanten Effekt des DMSO im Sinne einer Helligkeitszunahme für alle getesteten Einwirkzeiten gegenüber den Profilen vor Agensapplikation (Tab. 14, Normalbefund: d5-n, d10-n, d20-n). Diese ist bei Betrachtung der mittleren Helligkeitsprofile in Abbildung 45 über die ersten 20 Image points, welche histologisch der Superficialzellschicht entsprechen, besonders deutlich ausgeprägt. Nach Image point 20 verlaufen die Profile relativ dicht übereinander, während im Bereich zwischen Image point 30 und 50, dessen Gipfel der Reflexion an der Basalmembran entspricht, insbesondere das 10 und 20 Minuten Profil nochmals deutlich oberhalb des „neutralen“ Profils verlaufen. Ab Image point 50 verlaufen alle vier Profile relativ dicht aufeinander. Die Hauptwirkung des applizierten DMSO beschränkt sich bei den Normalbefunden folglich auf den Epithelbereich. Der beschriebene Effekt zeigt sich bereits ab der kürzesten Einwirkdauer von 5 Minuten und nimmt mit zunehmender Einwirkdauer noch weiter zu. Dabei zeigen die *p*-Werte der Tests eine signifikante Helligkeitszunahme nach 10 und 20 Minuten gegenüber der DMSO-Einwirkdauer von 5 Minuten (Tab.14, Normalbefund: d10-d5, d20-d5). Einen nicht signifikanten Unterschied ergab der Hotelling's T2 Test zwischen der Einwirkdauer von 10 und 20 Minuten, wobei der ADF Test hier einen signifikanten *p*-Wert lieferte (Tab.14, Normalbefund: d20-d10). Solch eine Abweichung von Ergebnissen konnten wir in einigen wenigen Fällen sowohl bei der Analyse der DMSO- als auch der PEG-Daten beobachten. Sie lässt sich damit erklären, dass verschiedene Tests von

verschiedenen Annahmen ausgehen, was gleichbedeutend damit ist, dass die Daten auf verschiedene Art befragt werden und somit abweichende Ergebnisse liefern können. Ein nicht signifikanter p -Wert im Hotelling's T2 Test gegenüber einer Signifikanz im ADF-Test ist damit erklärbar, dass der Hotelling's T2 Test die Größe von Differenzen zwischen den mittleren Differenzprofilen und nicht das Vorhandensein von Trends prüft. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den Normalbefunden im Epithelbereich die Helligkeit durch DMSO-Applikation bereits nach 5 Minuten signifikant zunimmt und dass der Effekt mit zunehmender Einwirkzeit signifikant ansteigt, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen der Einwirkzeit von 10 und 20 Minuten besteht.

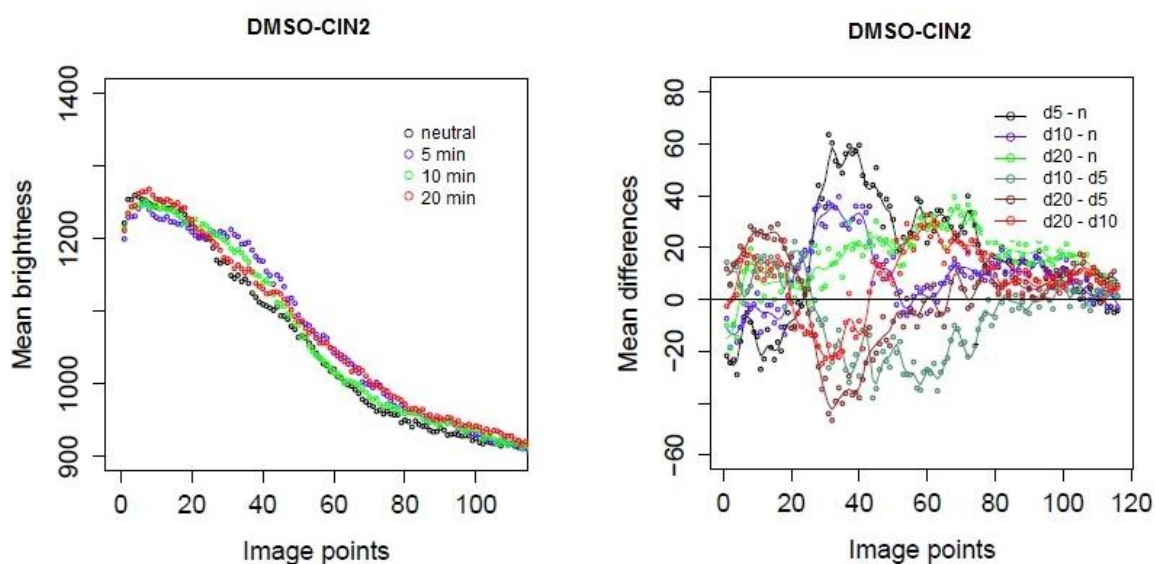


Abb. 46: Mittlere Helligkeitsprofile der CIN 2 Befunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten DMSO-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.

Bei den mittleren Differenzprofilen aus der CIN 2-Gruppe ergaben die von uns angewandten Tests ebenfalls einen signifikanten Effekt für alle untersuchten Einwirkzeiten gegenüber der „neutralen“ Bedingung (Tab.14, CIN 2: d5-n, d10-n, d20-n). Zu erwähnen ist jedoch, dass dieser im Vergleich zu den Normalbefunden je nach betrachtetem Bereich wesentlich stärker variiert (Abb. 46). Betrachtet man die mittleren Helligkeitsprofile insgesamt, so fällt der für eine CIN 2 charakteristische eingipflige und im Vergleich zu einem CIN 3-Profil etwas flachere Verlauf auf. Die nach der Applikation von DMSO beobachteten Effekte lassen sich auf drei Bereiche aufteilen. Bis zum Image point 20 zeigt sich durch die 5-minütige DMSO-Einwirkung zunächst eine Helligkeitsabnahme, die nach 10 Minuten wieder aufgehoben ist. 20 Minuten nach DMSO-Applikation ist eine leichte Helligkeitszunahme in diesem Bereich

zu beobachten. Zwischen Image point 20 und 50 zeigt sich eine Helligkeitszunahme die nach 5 Minuten am stärksten und mit zunehmender Einwirkdauer schwächer ausgeprägt ist. Ab Image point 50 verlaufen das 5 und 20 Minuten Profil fast aufeinander und deutlich oberhalb des „neutralen“ und 10 Minuten Profils. Statistisch ergab der Hotelling's T2 Test keinen signifikanten Unterschied im Verlauf dieser zwei Profile, während der ADF Test eine Signifikanz lieferte (Tab.14, CIN 2: d20-d5). Das 10 Minuten Profil verläuft ab Image point 50 knapp oberhalb des Verlaufs des „neutralen“ Profils und unterscheidet sich dabei signifikant von dem 5 und dem 20 Minuten Profil (Tab.14, CIN 2: d10-d5, d20-d10). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei den CIN2 Befunden nach 5 Minuten DMSO-Einwirkdauer bis zum Image point 20 zu einer signifikanten Helligkeitsabnahme und danach wiederum zu einer starken Helligkeitszunahme kommt. Bei 10-minütiger Einwirkdauer zeigt sich eine Helligkeitszunahme zwischen den Image points 20 und 50, während es 20 Minuten nach DMSO-Applikation zu einer Helligkeitszunahme über den gesamten Profilverlauf gegenüber dem „neutralen“ Profil kommt.

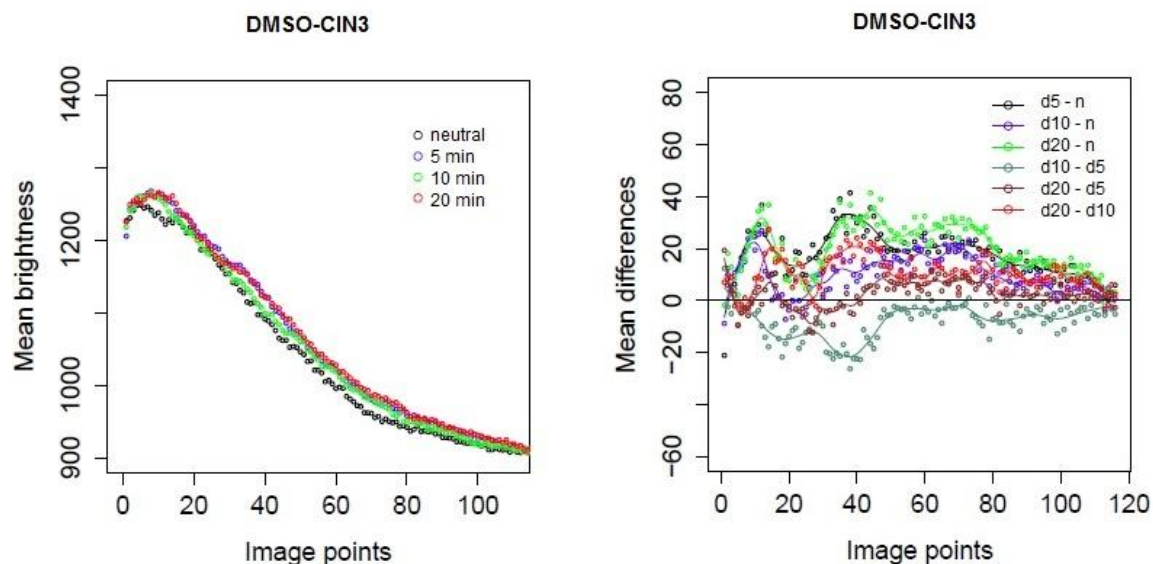


Abb. 47: Mittlere Helligkeitsprofile der CIN 3 Befunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten DMSO-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.

Betrachtet man die mittleren Helligkeitsprofile der CIN 3-Gruppe, so fällt auf, dass die Profile nach DMSO-Applikation einen etwas flacheren Verlauf gegenüber dem „neutralen“ Profil vor der Applikation von DMSO aufweisen (Abb. 47). Die Helligkeit nimmt durch das Auftragen von DMSO über die gesamte Gewebedicke zu. Dieser Effekt scheint nach 10-minütiger Einwirkdauer am schwächsten ausgeprägt zu sein. Dies ist am Verlauf des grünen 10 Minuten

Profils ersichtlich, welches ab Image point 20, im Gegensatz zu den beiden anderen Profilen, deutlich näher am dem schwarzen „neutral“ Profil verläuft. Dies spiegelt sich auch im mittleren Differenzprofil d10-d5 wider, welches als einziges im negativen Bereich verläuft. Insgesamt ergaben sowohl der Hotelling's T2 Test, als auch der ADF-Test signifikante p -Werte für alle mittleren Differenzprofile der CIN 3-Gruppe (Tab.14, CIN 3).

4.3.3 Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile nach PEG-Applikation

Insgesamt gingen in die Erstellung der mittleren Helligkeitsprofile der PEG-Gruppe 212 Einzelprofile ein. 132 davon waren der Gruppe der Normalbefunde zuzuordnen, während jeweils 44 und 36 Fälle unter die Gruppe der Inflammationen und CIN 3 fielen. In den Abbildungen 48 bis 50 sind die mittleren Helligkeitsprofile der Normalbefunde, Inflammationen sowie der CIN 3 Befunde jeweils für die „neutrale“ Bedingung (vor PEG-Applikation) sowie für die PEG-Einwirkzeit von 5, 10 und 20 Minuten abgebildet. Analog zur DMSO-Gruppe sind in den PEG-Abbildungen rechts neben den mittleren Helligkeitsprofilen die dazugehörigen mittleren Differenzprofile abgebildet, sowie der Tabelle 15 die p -Werte des Hotelling's T2 Tests (Hot) und des ADF-Tests zu entnehmen. Es sei nochmal darauf hingewiesen, dass ein großer p -Wert ($p > 0.05$) beim ADF-Test die Zurückweisung unserer Nullhypothese bedeutet. Analog zu den DMSO-Daten wurden auch die PEG-Daten mittels des Runs-Tests auf die Existenz von Trends hin geprüft. Dies ergab eine Signifikanz ($p = 0.000$) für alle geprüften mittleren Differenzprofile, weswegen hier aus Übersichtsgründen auf eine Darstellung der entsprechenden p -Werte in Tabelle 15 verzichtet wurde.

Befundgruppe	Mittlere Differenzen	p -Wert (Hot)	p -Wert (ADF)
Normalbefund	d5-n	0.011	0.825
	d10-n	0.426	0.974
	d20-n	0.616	0.959
	d10-d5	0.000	0.960
	d20-d5	0.000	0.950
	d20-d10	0.802	0.407
Inflammation	d5-n	0.195	0.595
	d10-n	0.053	0.961
	d20-n	0.000	0.121
	d10-d5	0.004	0.949
	d20-d5	0.000	0.974
	d20-d10	0.000	0.906
CIN 3	d5-n	0.000	0.691
	d10-n	0.000	0.720
	d20-n	0.000	0.574
	d10-d5	0.000	0.521
	d20-d5	0.000	0.442
	d20-d10	0.007	0.477

Tab. 15: p -Werte des Hotelling's T2 (Hot) und des Augmented Dickey-Fuller-Tests (ADF) für PEG.

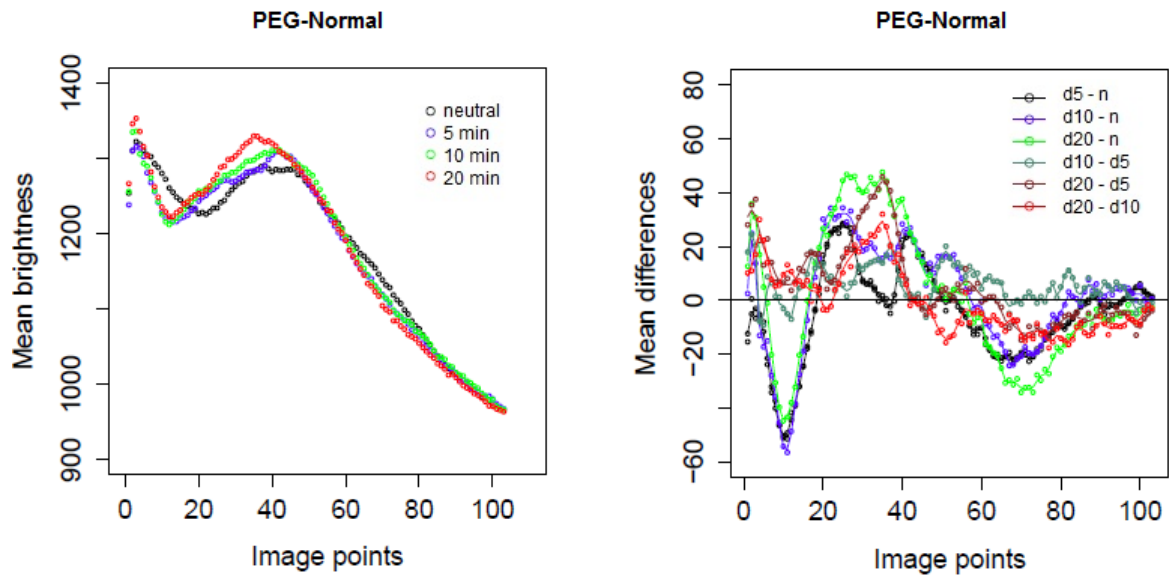


Abb. 48: Mittlere Helligkeitsprofile der Normalbefunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten PEG-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.

Wie aus den mittleren Helligkeitsprofilen in Abbildung 48 deutlich wird, nimmt in der Gruppe der Normalbefunde die Helligkeit nach Applikation von PEG über die ersten 20 Image points für alle Einwirkzeiten gleichermaßen ab. Zwischen den Image points 20 und 50 nimmt die Helligkeit mit zunehmender Einwirkdauer hingegen zu. Eine mit der Einwirkzeit zunehmende Helligkeitsminderung im tieferen Gewebsbereich zwischen den Image points 60 und 80, was histologisch dem Stroma entspricht, zeigt sich nach Applikation von PEG gegenüber dem „neutralen“ Profil. Der Hotelling's T2 Test ergab für die mittleren Differenzprofile bis auf das d10-n, d20-n und das d20-d10 Profil stets einen signifikanten p -Wert, während der ADF-Test in allen Fällen eine Signifikanz lieferte (Tab. 15, Normalbefund). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch die Anwendung von PEG bei den Normalbefunden in den dem oberen Epithelbereich entsprechenden Image points zu einer Helligkeitsabnahme und in den dem unteren Epithelbereich entsprechenden zu einer Zunahme kam. Im Bereich des Stromas bewirkte die PEG Applikation hingegen eine Helligkeitsminderung.

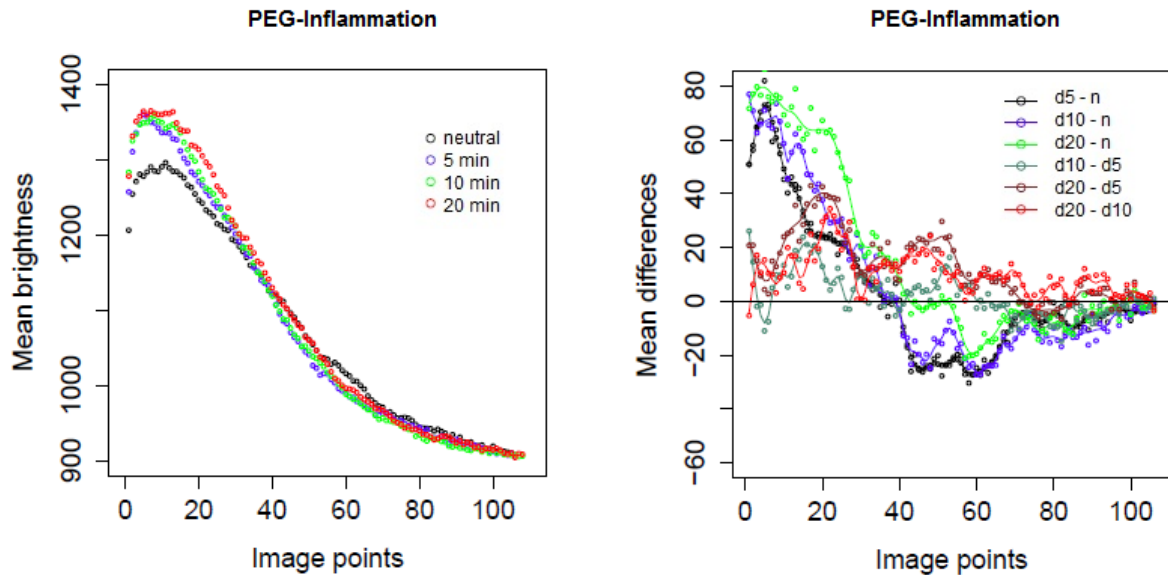


Abb. 49: Mittlere Helligkeitsprofile der Inflammationen vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten PEG-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.

Die mittleren Helligkeitsprofile aus der Gruppe der Inflammationen zeigen eine Helligkeitszunahme mit zunehmender Einwirkzeit bis zu Image point 40 (Abb. 49). Danach nimmt die Helligkeit ab, wobei eine längere Einwirkdauer zu einer geringeren Helligkeitsabnahme zu führen scheint. Bei der Testung der zugehörigen mittleren Differenzprofile wird der Effekt nach Agensapplikation gegenüber der „neutralen“ Bedingung ab einer Einwirkdauer von 10 Minuten sowohl vom Hotelling's T2 Test, als auch vom ADF-Test als signifikant erkannt (Tab.15, Inflammation: d10-n, d20-n), während sich für die PEG-Einwirkzeit von 5 Minuten nur im ADF-Test eine Signifikanz ergibt (Tab. 15, Inflammation: d5-n). Die mittleren Differenzprofile der verschiedenen Einwirkzeiten untereinander (Tab. 15, Inflammation: d10-d5, d20-d5, d20-d10) sind in allen angewandten Tests signifikant, was für eine stärkere Ausprägung des Effekts mit zunehmender Einwirkzeit spricht. Zusammenfassend kommt es durch die Applikation von PEG in der Befundgruppe der Inflammationen insgesamt zu einer signifikanten Helligkeitszunahme ab einer Einwirkdauer von 10 Minuten die sich über die ersten 40 Image points erstreckt und mit zunehmender Einwirkzeit weiter verstärkt. Dieser Bereich entspricht histologisch dem Epithel. In dem darauffolgenden, histologisch dem Stroma entsprechenden Bereich kommt es unter PEG-Applikation zu einer Abnahme der Helligkeit, die bei längerer Einwirkdauer geringer zu werden scheint.

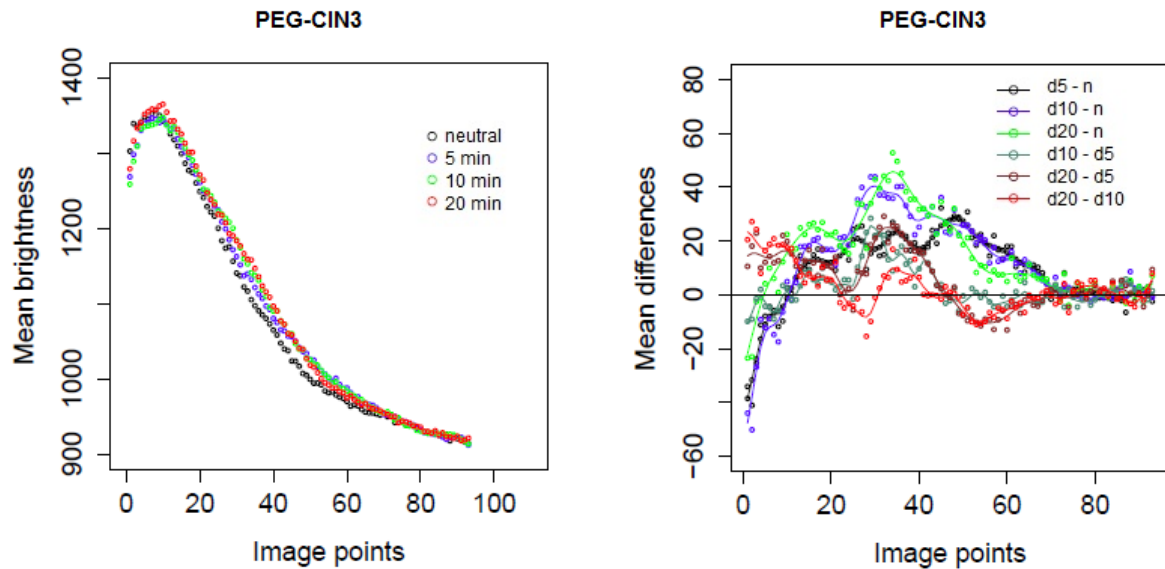


Abb. 50: Mittlere Helligkeitsprofile der CIN 3 Befunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten PEG-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.

In der CIN 3 Gruppe kam es durch die Behandlung der Präparate mit PEG, bis auf die ersten 10 Image points, mit zunehmender Einwirkzeit zu einer signifikanten Helligkeitszunahme über die gesamte Gewebedicke (Abb. 50). Dies spiegelt sich im kompletten Profilverlauf der mittleren Helligkeitsprofile und der mittleren Differenzprofile wider, in denen die 5, 10 und 20 Minuten Profile ab Image point 10 stets oberhalb des „neutralen“ Profils bzw. der Nulllinie verlaufen. Alle ermittelten *p*-Werte erwiesen sich dabei als signifikant (Tab. 15, CIN 3).

5. Diskussion

Die Optische Kohärenztomographie hat sich in zahlreichen Studien als ein wertvolles Instrument zur Visualisierung pathologischer sowie nicht pathologischer Veränderungen des Zervixepithels erwiesen. Anders als beim Auge handelt es sich bei dem hier untersuchten Zervixepithel jedoch um ein nicht transparentes Medium, in dem die Lichteindringtiefe durch Streuung und Absorption auf wenige Millimeter begrenzt ist. Die zusätzliche Veränderung der Gewebebeschaffenheit, wie es z.B. bei einer Inflammation der Fall ist, führt darüber hinaus zu einer weiteren Defokussierung und Abschwächung des einfallenden Lichts, wodurch die Qualität der OCT-Bilder mit zunehmender Tiefe abnimmt. Die Verbesserung der Einsehbarkeit nicht transparenter Medien durch sogenannte optical clearing agents (OCA) ist Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsprojekte. Durch die verschiedenen angewandten Agenzien erhofft man sich eine Optimierung der optischen Eigenschaften im Sinne einer höheren Lichttransparenz unter gleichzeitigem Erhalt der zur Bildentstehung notwendigen gerichteten Rückstreuung der zu untersuchenden Gewebe zu erlangen, da dies die auf Licht basierenden optischen Untersuchungsmethoden zur Diagnostik und Therapie verbessern würde. Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war zum einen die Auswirkung der in der Gynäkologie routinemäßig während der kolposkopischen Untersuchung angewandten Essigsäure, sowie zum anderen die Auswirkungen der optischen Clearingmittel DMSO und PEG auf die OCT. Im Folgenden sollen die erzielten Ergebnisse diskutiert werden.

5.1 Diskussion von Material und Methoden

Im Rahmen dieser Studie konnten 34 Patientinnen rekrutiert werden, welche ihre Zustimmung zur postoperativen Untersuchung ihres Konuspräparats gaben. Da in einem einzelnen Präparat mehrere unterschiedliche Läsionen neben benignen Veränderungen sowie gesunden Arealen gleichzeitig bestehen können wurden pro Präparat immer mindestens vier und höchstens sechs unterschiedliche Lokalisationen untersucht. Dadurch ergab sich trotz einer verhältnismäßig geringen Anzahl an Patientinnen in unserem Studienkollektiv eine zur statistischen Auswertung ausreichend große Menge an Bildmaterial. Da die Wirkung von drei unterschiedlichen Agenzien Essigsäure, DMSO und PEG auf die Qualität der OCT untersucht werden sollte, wurde das Patientenkollektiv dementsprechend auf drei vergleichbar große Gruppen aus jeweils 10, 11 und 13 Patientinnen aufgeteilt. Es ist zu erwähnen, dass die Anzahl an OCT-Bildern pro unterschiedlicher Befundkategorie (Normalbefund,

Inflammation, Zylinderepithel, CIN 1-3) stichprobenabhängig war, wodurch die Befundkategorien unterschiedlich oft im gesamten Bildmaterial sowie auch in den einzelnen Patientengruppen repräsentiert sind. So waren in allen drei Patientengruppen die Normalbefunde am häufigsten und CIN 3-Befunde am zweit-, bzw. dritthäufigsten vertreten (s. S. 57, Tab. 10). In unserem Studienkollektiv gab es keinen Fall eines invasiven Karzinoms. Aus diesem Grund ist eine gewisse Verzerrung, sog. Bias, der Ergebnisse in der Beurteilung der OCT-Bilder durch das häufigere Vorkommen gewisser Befunde gegenüber anderen nicht auszuschließen.

In unserer Studie wurde ein TD-OCT Gerät mit einer lateralen Auflösung von $\leq 50 \mu\text{m}$ und einer axialen Auflösung zwischen $10\text{-}20 \mu\text{m}$, sowie einer Scanrate von $0,66 \text{ Hz}$ verwendet. Dieses Gerät fand bereits in den Vorarbeiten zu dieser Arbeit erfolgreich Anwendung und zeichnet sich durch seine einfache Handhabung im klinischen Alltag sowie seine Zuverlässigkeit in der Akquisition der OCT-Bilder aus [135, 136]. Ein neueres OCT-Gerät, welches 2012 dem Laser Forschungs Labor – Life Science Center der LMU durch die Firma Imalux zur Verfügung gestellt wurde, wies mit 8 fps (frames per second) eine höhere Akquisitionsrate auf und hatte bei einer größeren Sonde eine laterale Scanbreite von 5 mm sowie zusätzlich eine leicht bessere Messtiefe von $2,5 \text{ mm}$. Dieses Gerät konnte allerdings aufgrund technischer Mängel nicht wie geplant für unsere Studie verwendet werden. Die Technik der optischen Kohärenztomographie hat sich seit ihrer Entdeckung im Jahre 1991 und dem Beginn des kommerziellen Einsatzes in der Ophthalmologie im Jahre 1996 rasant weiterentwickelt und verbessert. Dabei konnte sich das FD-Modell aufgrund seiner Vorteile wie der höheren Bilderfassungsgeschwindigkeit und Sensitivität gegenüber dem TD-Modell durchsetzen [137]. Derzeit sind für FD-OCT Systeme $50\text{-}100$ Mal schnellere Scanraten gegenüber dem konventionellen TD-OCT beschrieben [138]. Solche schnellen Scanraten sind insbesondere bei Untersuchungen direkt am Patienten sinnvoll, da sie zum einen die Untersuchungszeit verkürzen und zum anderen Artefakte aufgrund von Bewegung minimieren. Weiterhin ermöglichen sie auch die Generierung von 3D Bildern, was in einer Vorgängerarbeit untersucht wurde und sich als potentiell nützlich zur weiteren Verbesserung der Diagnostik an zervikalem Epithel herausstellte [139]. In der aktuellen Literatur ist für die neueren OCT-Geräte eine axiale x laterale Auflösung von $1 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ beschrieben [140]. Diese ist der axialen x lateralen Auflösung von $10\text{-}20 \mu\text{m} \times \leq 50 \mu\text{m}$ des in unserer Arbeit verwendeten OCT-Geräts überlegen und würde höchstwahrscheinlich die von uns in dieser Arbeit untersuchten, durch die Essigsäure bzw. die Clearingmittel DMSO und PEG ausgelösten Effekte auf die Bildqualität der OCT mit einer höheren Sensitivität erfassen

können. In den vergangenen Jahren gab es auf dem Gebiet der OCT zahlreiche neue Weiterentwicklungen. Dies hatte zur Folge, dass zusätzliche Informationen aus dem untersuchten Gewebe gewonnen werden können. Hervorzuheben sind dabei die Doppler-OCT (DOCT), die polarisations-sensitive OCT (PS-OCT), die spektroskopischen-OCT (SOCT) sowie die molekulare-OCT welche derzeit an ex vivo sowie in vivo Modellen erprobt werden und von denen man sich einen weiteren Qualitätszugewinn erhofft [140].

Im Rahmen unserer Arbeit beschäftigten wir uns unter anderem mit der Beobachtung der Auswirkungen von Essigsäure auf die Qualität der OCT-Bilder von zervikalem Gewebe. Der Einsatz der Essigsäure in der Gynäkologie wurde längere Zeit nach der Einführung des Kolposkops im Jahre 1925 beschrieben [141]. Seither wird sie in der Kolposkopie zur Visualisierung von pathologischen Arealen an der Portio, Vulva und Vagina verwendet, wobei die genauen zellulären und subzellulären Mechanismen dieser Reaktion bis heute noch nicht vollends geklärt sind. In den dieser Studie vorausgegangenen Arbeiten konnte durch die Applikation von 3% sowie von 5% Essigsäure keine relevante Auswirkung auf die Darstellung des zervikalen Gewebes in vivo und ex vivo beobachtet werden [135, 136]. Da jedoch eine zukünftige Anwendung der OCT zur klinischen Diagnostik direkt am Patienten im OP sowie während der Kolposkopie und somit automatisch auch immer in Kombination mit der Essigprobe (visual inspection after acetic acid, VIA) naheliegt, hielten wir es für sinnvoll der Frage nach der Wirkung der Essigsäure auf die OCT weiter nachzugehen.

Für gewöhnlich setzt die Essigreaktion ca. 10 Sekunden nach dem Auftragen der Essigsäure ein und hält dann für einige Minuten an. Weiterhin ist bekannt, dass die Wirkung der Essigsäure auf das Zervixepithel von der Konzentration der Lösung abhängig ist und dass verdünnte Lösungen (1% bzw. 2%) gegenüber höher konzentrierten Lösungen zu einem langsameren Einsetzen und schnellerem Abklingen der Reaktion führen [72]. Mit diesem Hintergrundwissen und aufgrund der Beobachtungen mit 3% bzw. 5% Essigsäure aus den vorigen Arbeiten entschieden wir uns in dieser Studie zur Anwendung von 6% Essigsäure. Das von uns gewählte Zeitintervall von 0 bis 10 Minuten ergab sich aus einer Studie von Pogue et al. welche eine erhöhte Lichtrückstreuung des Zervixepithels nach Applikation von Essigsäure über eine Dauer von 10 Minuten beschrieb [142].

Weiterhin untersuchten wir in unserer Studie inwiefern sich die OCA DMSO und PEG auf die Qualität der OCT-Bilder von zervikalem Epithel auswirken. In der Literatur sind eine Vielzahl verschiedener Clearingmitteln beschrieben worden, die sich als vielversprechend bezüglich

ihres Clearingeffekts auf nicht transparentes Gewebe herausstellten. Wie bereits erwähnt lassen sich diese Agenzien in vier Gruppen (Alkohole, Zucker, organische Säuren sowie organische Lösungsmittel) aufteilen [117]. Eine in vivo Studie von Millon et al., welche an Plattenepithel von Goldhamsterbacken durchgeführt wurde, zeigte eine signifikante Abnahme der Absorption und Streuung des Lichts im Gewebe durch die Applikation von 100% DMSO. Dieser Effekt konnte in einem Zeitintervall von 5 bis 45 Minuten nach Agensapplikation beobachtet werden. Zum Erreichen der Lichtdurchlässigkeit des Gewebes wurde eine Dauer von mindestens 20 Minuten beschrieben, wobei durch die Überschreitung der 20 Minuten das Gewebe zunehmend steifer und schwieriger zu untersuchen war [119]. Dementsprechend verwendeten wir für unsere Untersuchungen DMSO in einer Konzentration $\geq 99,9\%$ über ein Zeitintervall von 0 bis 20 Minuten.

Analog dazu untersuchten wir die Auswirkungen von PEG 400 in einer Konzentration $\geq 99,5\%$ als weiteres Clearingmittel über dasselbe Zeitintervall. Die Auswahl von PEG 400 geschah auf Grundlage einer Studie von Mao et al., in der das Potential von sechs Clearingmitteln aus der Gruppe der Alkohole, darunter auch von PEG 400, untersucht wurde. In der Studie konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Anzahl an Hydroxylgruppen auch die Effektivität des Clearings stieg, während der Brechungsindex und die Molekülgröße für den Effekt nicht von Bedeutung zu sein schienen [121]. Die Untersuchung weiterer vielversprechender Clearingmittel wie beispielsweise Glycerol oder der von uns nicht berücksichtigten Gruppe der Zucker hätte den zeitlichen und logistischen Rahmen unserer Studie gesprengt. Aus diesem Grund erachten wir es für sinnvoll und nötig, dass weitere Untersuchungen unter Berücksichtigung der eben genannten Substanzen zum weiteren Erkenntniszugewinn und der Optimierung der optischen Eigenschaften von zervikalem Gewebe zur Diagnostik mittels OCT durchgeführt werden.

Die Untersuchung der Wirkung von Essigsäure und der optischen Clearingmittel DMSO und PEG auf die optische Kohärenztomographie konnte nicht direkt am Patienten in vivo erfolgen, da sowohl die Essigsäure, als auch DMSO und PEG in der von uns in dieser Studie verwendeten Konzentration am Patienten nicht zulässig sind. Die Untersuchung erfolgte aus diesem Grund ex vivo an Konuspräparaten die im Rahmen von den standardmäßig in unserer Klinik durchgeführten Schlingenkonisationen (LEEP) gewonnen wurden. Da das Augenmerk unserer Studie auf der Untersuchung der Veränderungen der optischen Gewebeeigenschaften durch die Anwendung der Essigsäure, DMSO und PEG lag, war es von besonderer Bedeutung, dass die optischen Eigenschaften der Präparate nicht schon vor der Applikation

der Agenzien durch anderweitige äußere Einflüsse verändert wurden. Zu diesem Zweck konnten wir auf ein ex vivo Modell eines menschlichen zervikalen Konuspräparats zurückgreifen, welches in einer Vorgängerstudie zu der hier vorliegenden Studie bereits etabliert und validiert worden war. In der beschriebenen Studie wurde untersucht, inwiefern sich die Gewebestruktur bei postoperativer Aufbewahrung des Konuspräparats in isotoner Kochsalzlösung (0,9% NaCl), mit zunehmender Zeit nach Entnahme verändert. Dies wurde anhand von OCT-Bildern, welche unmittelbar nach Entnahme, sowie wiederholt an derselben Stelle nach einer Dauer von 1, 2, 3 und 4 Stunden postoperativ gewonnen wurden, getestet. Für jedes OCT-Bild wurde ein Helligkeitsprofil, analog zu den Helligkeitsprofilen in unserer Studie, erstellt und die Helligkeitsprofile der OCT-Bilder zu den unterschiedlichen Wartezeiten mittels Diskriminanzanalyse auf systematische Unterschiede untereinander geprüft. Dabei ergaben sich innerhalb des untersuchten Zeitintervalls von 4 Stunden keine Hinweise auf signifikante Veränderungen der optischen Eigenschaften des untersuchten zervikalen Gewebes [127]. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses kann auch im Falle unserer Studie davon ausgegangen werden, dass die von uns beobachteten Effekte auf die OCT-Bilder tatsächlich auf die applizierten Agenzien zurückzuführen sind. Ob die beobachteten Effekte auch in vivo reproduzierbar sind müsste zukünftig in weiteren Untersuchungen anhand von entsprechenden in vivo Modellen geprüft werden.

Da in unserer Studie die Auswirkungen der Agenzien über einen gewissen Zeitraum beobachtet und dokumentiert werden sollten, war es von großer Bedeutung nach den neutralen Aufnahmen vor Applikation der Agenzien möglichst exakt immer wieder dasselbe Areal im Gewebe mit der OCT-Sonde zu treffen. In einer Vorgängerstudie zu dieser Arbeit wurde zur Orientierung am Präparat und zur Vermeidung von Rotationseffekten während des Untersuchens der Konus einerseits mit einer Fadenmarkierung versehen (meist bei 12 Uhr), sowie auf einer mit einem Fadenkreuz markierten Unterlage fixiert [136]. Durch das Auflegen von Papierkreisen auf die Untersuchungsstelle, die dem Durchmesser der verwendeten Sonde entsprachen, konnte die Genauigkeit des Wiedererfassens des zuvor in nativ dargestellten Areals nach der Applikation eines der drei Agenzien in dieser Arbeit noch zusätzlich gesteigert werden. Dennoch war eine gewisse Restungenauigkeit nicht auszuschließen. Diese konnte beispielsweise bei einem gegenüber der Voruntersuchung leicht veränderten Winkel beim Aufsetzen der Sonde auf das Gewebe durch das manuelle Handling der Sonde, sowie durch das eventuelle Verrutschen der Papierkreise durch versehentliche Manipulation während des Untersuchungsvorgangs zustande kommen. Eine weitere mögliche Quelle für Ungenauigkeiten stellte die Korrespondenz des mittels OCT erfassten Areals mit der

zugehörigen Histologie dar. In einer Vorgängerarbeit zu dieser Arbeit wurde für jedes Präparat eine Skizze mit den Untersuchungsstellen für die Pathologin angefertigt [136]. Wir versuchten in der vorliegenden Arbeit die Übereinstimmung noch weiter zu verbessern indem wir jeweils in die Mitte des Papierkreises eine Stecknadel positionierten und mit der Pathologin die Vereinbarung trafen im Umkreis von 3 mm um die Stecknadel das Epithel oberflächlich mit schwarzer Tusche zu markieren. Dadurch konnte das möglichst genaue Wiederauffinden der den jeweiligen OCT-Bildern entsprechenden histologischen Areale an den Präparaten gewährleistet werden, ohne die Beurteilbarkeit der Präparate für die nach der OCT Untersuchung folgenden histopathologischen Untersuchung zu beeinträchtigen.

Die Akquirierung der OCT-Bilder und die Dokumentation der dazugehörigen Histologie mittels Photomikroskop wurden von der Doktorandin vorgenommen, während die Befundung der OCT-Bilder durch eine erfahrene Untersucherin erfolgte, die nicht in den Akquirierungsprozess der OCT-Bilder involviert war. Der Untersucherin war zum Zeitpunkt der Befundung nicht bekannt von welcher Patientin und Lokalisation die OCT-Bilder stammten. Desweiteren waren ihr auch das Ergebnis des zytologischen Abstrichs, der HPV Status, der kolposkopische sowie der histologische Befund der Probiopsie unbekannt. Es lag folglich eine einfache Verblindung vor. Dennoch ist wie auch schon in den Vorgängerstudien davon auszugehen, dass bei der Beurteilung der OCT-Bilder ein gewisser Bias vorlag [135, 136]. Denn obwohl die Untersucherin die genaueren anamnestischen Angaben der Patientinnen nicht kannte, war ihr durchaus bewusst, dass die Indikationsstellungen zur Konisation meist aufgrund einer histologisch gesicherten CIN 3 erfolgt waren. Es ist folglich anzunehmen, dass die Untersucherin durch diese Hintergrundinformation in ihrer Befundung bis zu einem gewissen Grad beeinflusst wurde. Ebenfalls zu erwähnen ist, dass die Untersucherinnen beim Rating der OCT-Bilder durch das Vorwissen aus der Literatur über die Wirkung der Agenzien auf die Helligkeit, den Kontrast sowie die Tiefe in ihrem Urteil beeinflusst worden sein könnten.

Die in dieser Studie betrachtete Nullhypothese, der zufolge die Differenzen eines mittleren Differenzprofils zufällig um den Wert Null variieren, wurde in der vorliegenden Arbeit auf vier verschiedene Weisen statistisch getestet. Dabei fand zur Analyse der Daten aus der Essigsäuregruppe der KPSS-Test Anwendung, während für die Analyse der DMSO und PEG-Daten der Hotelling's T2 Test, der Runs-Test sowie der ADF-Test ausgewählt wurden. Es stellt sich berechtigterweise die Frage nach dem Grund der Anwendung mehrerer verschiedener Tests, was nachfolgend näher erläutert werden soll. Die verschiedenen Tests

fokussieren jeweils auf verschiedene Aspekte der mittleren Differenzprofile. Es besteht folglich die Möglichkeit, dass für ein gegebenes mittleres Differenzprofil alle Tests ein signifikantes Ergebnis liefern. Ebenso ist es möglich, dass bestimmte Tests kein signifikantes Resultat liefern, andere aber signifikante p -Werte, also p -Werte kleiner als 0.05, ergeben. Nur wenn alle Tests keinen signifikanten p -Wert ergeben wird man die Alternativhypothese eindeutig zurückweisen wollen. Betrachtet man zum Beispiel nur den Hotelling's T2-Test, so lässt ein signifikanter p -Wert, noch keinen Schluss auf einen Trend zu, obwohl die Inspektion der grafischen Abbildungen der mittleren Differenzprofile einen solchen Schluss nahelegen würde. Signifikante p -Werte für den Runs-Test oder einen Trend-Test weisen auf Trends in einem mittleren Differenzprofil hin, die auch für kleine individuelle Differenzen existieren können. Liefert bei einem mittleren Differenzprofil der KPSS-Test keinen signifikanten p -Wert, so kann man darauf schließen, dass es kein hinreichend großes Gefälle von Differenzwerten von einem Bereich von Image points zu einem anderen Bereich von Image points gibt. Es könnten jedoch sehr wohl systematische Variationen, sog. „Oszillationen“ von Helligkeitswerten zwischen verschiedenen Bereichen von Image points bestehen, die durch den Test nicht detektiert werden. Die Verwendung verschiedener Tests ermöglichte also eine Spezifizierung der Alternativhypothese, d.h. der Hypothese, dass es systematisch von Null abweichende Differenzen in einem mittleren Differenzprofil gibt. Diese Spezifizierung erschien uns durchaus sinnvoll, da sich die von uns untersuchten Agenzien in Abhängigkeit von der Einwirkdauer und Gewebeveränderungen in unterschiedlicher Weise auf das untersuchte Gewebe, bzw. den Gewebeabschnitt auswirkten.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die OCT-Methode hat sich über die Jahre als geeignetes Untersuchungsverfahren zur Anwendung direkt am Patienten herauskristallisiert. Bis zu einer mit dem Ultraschall vergleichbaren klinischen Routine ist es jedoch, die Ophthalmologie ausgenommen, noch ein weiter Weg. Eine bedeutsame Einschränkung in der Anwendung optischer diagnostischer Methoden an nicht transparentem Gewebe wie es bei der Zervix im Gegensatz zum optisch transparenten Auge der Fall ist, ist die durch die Lichtabsorption und die mehrfache Streuung an den Gewebekomponenten limitierte Einsicht. Durch die Anwendung optischer Clearingmittel erhofft man sich eine Optimierung der optischen Eigenschaften nicht transparenter Gewebe, wobei die genauen Clearingmechanismen sehr komplex und teilweise noch unverstanden sind. Eine rasche aber dennoch sichere Beurteilung der OCT-Bilder in Echtzeit ist für den klinischen Gebrauch wünschenswert, dafür muss die Methode jedoch weiter verbessert werden. Zu diesem Zweck war es uns wichtig, sowohl die qualitativen Auswirkungen von Essigsäure, sowie der Clearingmittel DMSO und PEG, als auch die quantitativen Auswirkungen in Hinblick auf einen zukünftig möglichen computergesteuerten Algorithmus zur Unterstützung der visuellen Beurteilung in Echtzeit zu untersuchen.

5.2.1 Diskussion der Ergebnisse aus der qualitativen Analyse

Die qualitative Analyse der OCT-Bilder diente der Untersuchung der visuell durch den Untersucher wahrnehmbaren Auswirkungen der Agenzien am Präparat. Ein zentrales Ergebnis der qualitativen Analyse war, dass weder durch die Applikation von Essigsäure, noch durch die von DMSO oder PEG eine signifikante Auswirkung auf die Befunderhebung beobachtet werden konnte. Dies wird aus der prozentualen Übereinstimmung der Befunde zwischen der OCT und der Histologie zu den verschiedenen Einwirkzeiten der unterschiedlichen Agenzien deutlich (Essigsäure: 87%, 85%, 82%, DMSO: 98%, 94%, 96%, 96% und PEG: 97%, 98%, 97%, 98%). Die Applikation der von uns untersuchten Agenzien hat somit zunächst keine direkte Auswirkung auf die klinische Anwendung der OCT. Dennoch konnten durch die Applikation der Agenzien gewisse Veränderungen bezüglich der Helligkeit, des Kontrasts und der Tiefe in der OCT beobachtet werden, was wir anhand des Ratings zu quantifizieren versuchten. Diese Veränderungen führten in unserer Studie zwar nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Unterscheidung zwischen den verschiedenen histologischen Befunden, sie beeinflussten jedoch die Qualität der OCT-Bilder im positiven Sinne und könnten daher einen potentiellen Ansatz zur Verbesserung der Diagnostik darstellen. Die Evaluation der subjektiv

vom Untersucher wahrgenommenen Unterschiede von Helligkeit, Kontrast und Tiefe vor und nach der Einwirkung der verschiedenen Agenzien ergab kleine Unterschiede. Die Applikation von Essigsäure bewirkte im Auge des Untersuchers für die Normalbefunde, CIN 3 und Inflammationen eine signifikante Helligkeitszunahme (s. S. 68, Abb. 26). Dies steht im Widerspruch zu den vorangegangenen Arbeiten, in denen keine Auswirkung durch die Applikation von Essigsäure beschrieben wurde [135, 136]. In Anbetracht der Essigprobe, die klinisch zur Detektion von Dysplasien angewandt wird und die laut Literatur in geringerem Maße auch in normalem Plattenepithel die Lichtreflexion erhöht, erscheint dieses Ergebnis jedoch schlüssig [143]. Weiterhin ergab sich nach Essigsäureapplikation eine signifikante Verbesserung der Tiefe für die Normalbefunde nach 10 Minuten und die CIN 3-Befunde nach 3 Minuten, sowie eine Kontrastverschlechterung, die nur für die Normalbefunde nach 10 Minuten signifikant war (s. S. 68, Abb. 26). Die zuletzt genannten Ergebnisse waren jedoch nicht so eindeutig wie die der Helligkeitszunahme und sind in Anbetracht der äußerst subjektiven Beurteilungskriterien mit Vorsicht zu betrachten. Die Rating Analyse für DMSO ergab für alle Befundgruppen ab 5 Minuten eine signifikante Zunahme der Helligkeit, sowie eine signifikante Tiefenzunahme die für die Normalbefunde ab einer Einwirkzeit von 10 Minuten und für CIN 3 ab 5 Minuten einsetzte (s. S. 73, Abb. 30). Dies deckt sich teilweise mit den Ergebnissen von Wang et al. die durch die Applikation von DMSO eine schnell einsetzende Tiefenzunahme in der OCT-Untersuchung von Gewebe aus Schweinemägen beobachteten, während bezüglich des Kontrasts keinerlei Effekte beschrieben wurden [112]. In unserer Studie wurde der Kontrast bei der CIN 3 ab 10 Minuten DMSO Einwirkung und bei den Normalbefunden unabhängig von der Einwirkzeit allerdings als signifikant besser empfunden (s. S. 73, Abb. 30). Am deutlichsten wirkte sich für die Untersucher in der subjektiven Analyse die Applikation von PEG aus. Hier verbesserten sich die Helligkeit, der Kontrast und die Tiefe signifikant für Normalbefunde, Inflammationen und CIN 3. Im Falle der Tiefe bei Inflammation und CIN 3, sowie der Helligkeit bei CIN 3, setzte eine signifikante Verbesserung ab einer PEG-Einwirkzeit von 10 Minuten ein (s. S. 78, Abb. 34). Eine Studie von Wen et al. zeigte, dass das Einmassieren von PEG auf intakter Rattenhaut in vivo eine direkt anhand der OCT-Bilder sichtbare Zunahme des Signals um das 1,5-fache in der Tiefe bewirkte, wobei durch die gleichzeitige Anwendung von PEG, der physikalischen Massage und eines Penetrations enhancer sogar eine Zunahme um das Dreifache erreicht werden konnte [122]. Insgesamt erwies es sich als schwierig die Auswirkungen der Agenzien auf die Qualität der OCT-Bilder qualitativ zu beurteilen, da es sich bei den Effekten meist um kleine,

mit dem bloßen Auge schwer erfassbare Unterschiede zu den OCT-Bildern vor Applikation der Agenzien handelte.

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse aus der quantitativen Analyse

Die quantitative Analyse anhand von Helligkeitsprofilen hat sich bereits in den dieser Arbeit vorausgegangen Studien als wertvolles Hilfsmittel zur Objektivierung der mittels OCT erfassten Befunde herausgestellt [135, 136]. Ein Helligkeitsprofil ergibt sich wie bereits im Material und Methoden Teil erläutert aus den gemittelten Helligkeitswerten der Pixel einer horizontalen Reihe (Image point) über die gesamte erfasste Gewebedicke und stellt damit die Intensität des am untersuchten Gewebe reflektierten und durch die OCT detektierten Signals dar. Dadurch wird die Darstellung von Effekten im OCT-Bild möglich, die mit dem bloßen Auge des Untersuchers nicht zu quantifizieren sind. Dies erleichterte uns die Analyse der durch die Essigsäure und durch die optischen Clearingmittel DMSO und PEG ausgelösten Effekte auf die Bildqualität in der OCT.

5.2.3 Diskussion der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile für Essigsäure

Die Ergebnisse aus der quantitativen Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile zeigten, dass es durch die Applikation der Essigsäure insgesamt zu einer signifikanten Helligkeitszunahme im Epithel kam. Diese ließ sich unabhängig von der histologischen Einordnung des untersuchten Gewebes in allen von uns berücksichtigten histologischen Kategorien (Normalbefunde, Inflammation, CIN 3) beobachten (s. S. 84, Tab. 13). Dabei waren allerdings von den Gewebeveränderungen abhängige Unterschiede bezüglich des zeitlichen Auftretens, des betroffenen Gewebeabschnitts sowie der Intensität der Effekte zu erkennen. Im Falle der Normalbefunde zeigte sich eine Helligkeitszunahme die bereits nach 3 Minuten eintrat und sich nach 10 Minuten noch weiter verstärkte. Der zweigipflige Verlauf der mittleren Helligkeitsprofile, welcher charakteristisch für Normalbefunde ist, war dabei auch weiterhin vorhanden, wenn auch etwas geringer akzentuiert. Das unterstreicht die bereits genannte, subjektiv empfundene Kontrastminderung nochmals. Weiterhin zeigte sich in der Gruppe der Normalbefunde eine leichte Helligkeitszunahme im Stroma, im Sinne einer Tiefenzunahme des OCT-Signals. Die entsprechenden mittleren Differenzprofile machen diesen Effekt deutlich, da sie über den kompletten Profilverlauf oberhalb der Nulllinie verlaufen (s. S. 86, Abb. 42). Dieses Ergebnis stimmt mit den Aussagen aus mehreren Arbeiten überein, in denen eine Zunahme der Lichtreflexion durch das Auftragen von

Essigsäure nicht nur bei neoplastisch veränderten, sondern auch bei normalen Zellen beschrieben wurde [143-145]. Als Hauptreflexionszentren wurden das Zytoplasma sowie der Zellkern beschrieben. Die Zunahme der Lichtreflexion als Folge der Essigsäureapplikation ist dabei laut Literatur für den Zellkern stärker ausgeprägt als für das Zytoplasma [143]. Dies könnte die in dysplastischem Epithel stärker ausgeprägte Essigreaktion erklären, da dort im Allgemeinen auch eine verschobene Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns vorliegt. Damit übereinstimmend ergab die Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile aus der Gruppe der CIN 3 Befunde eine im Vergleich zu den Normalbefunden deutlich stärkere Helligkeitszunahme, die im oberen Epithelbereich bereits 3 Minuten nach Essigsäureapplikation ihre Maximalausprägung erreicht hatte. Für denselben Gewebereich führte eine weitere Verlängerung der Einwirkzeit wiederum zu einer Helligkeitsabnahme, während es im unteren Epithelbereich zu einer Helligkeitszunahme gegenüber der kürzeren Einwirkdauer von 3 Minuten kam (s. S. 88, Abb. 44). Dies lässt sich gut mit der Aussage aus der Arbeit von MacLean in Zusammenhang bringen, in der ein schnelleres Eintreten der Essigreaktion in CIN 3 Gewebe im Vergleich zu CIN 1 Gewebe beschrieben ist. Der Grund für die stärkere und schnellere Ausprägung der Reaktion in hochgradig dysplastischem Gewebe liegt laut seiner Aussage in der kürzeren Distanz, welche durch die Essigsäure bis zum Erreichen des dysplastischen Epithels zurückgelegt werden muss [72]. Die starke Helligkeitsabnahme ab dem Image point von ca. 50, welche derart deutlich nur bei den CIN 3 Befunden beobachtet werden konnte, ist möglicherweise durch die starke Zunahme der Lichtreflexion an den oberflächlichen Epithelschichten und der daraus folgenden Blockierung der Lichtprogression in das tieferliegende Gewebe zu erklären. Bei Betrachtung der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile der Inflammation fällt auch hier eine ab 3 Minuten Einwirkzeit voll ausgeprägte Helligkeitszunahme im Epithelbereich und darauffolgend eine im Vergleich zur CIN 3 um einiges geringer ausgeprägte Helligkeitsabnahme im Stroma auf (s. S. 87, Abb. 43). Diese ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass es im Rahmen einer Inflammation zu einer Einwanderung von Entzündungszellen und somit auch zu einer höheren Dichte an Zellen und lichtbrechenden Zellbestandteilen im Epithel kommt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch die Einwirkung von Essigsäure zu einer Veränderung der Helligkeit in zervikalem Gewebe kommt und dass diese Veränderung (im Sinne einer Zu- oder Abnahme) spezifisch für eine bestimmte histologische Gewebebezugshöherigkeit, sowie für einen bestimmten Gewebereich ist. In einer Studie von Belinson et al. wurde die Helligkeit von zervikalem Gewebe mit Hilfe der OCT in kleinen Abschnitten, meist aus den oberen 0,2 mm des Epithels, gemessen und daraufhin untersucht

inwiefern sich die Helligkeitswerte je nach histologischem Befund unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass anhand der Helligkeitswerte eine Unterscheidung zwischen Normalbefund, Metaplasie, den verschiedenen Dysplasiegraden und einem invasiven Karzinom möglich ist [109]. Dies bestätigt die Ergebnisse der Studie von Zuluaga et al., in welcher gezeigt werden konnte, dass es signifikante Unterschiede im Reflexionsverhalten zwischen normalem und dysplastischem Gewebe gibt. Dabei waren die Helligkeitswerte im dysplastischen Epithel prämenopausaler Frauen gegenüber dem normalen Epithel signifikant höher, während es sich bei postmenopausalen Patientinnen aufgrund der in der Menopause zugunsten des Kerns veränderten Kern-Plasma Relation genau umgekehrt verhielt [108].

Bei der OCT Untersuchung handelt es sich einerseits zwar um eine subjektive und damit untersucherabhängige Methode, diese kann aber durch zusätzliche Hilfsmittel, wie beispielsweise Helligkeitsmessungen, weiter objektiviert und verbessert werden. Der Ansatz der quantitativen Auswertung von OCT-Bildern durch Computer-Algorithmen besteht schon seit längerer Zeit und erscheint sinnvoll zur Verbesserung der Methode. Im Gegensatz zu der oben genannten Studie, in der die Helligkeitswerte von bestimmten Epithelabschnitten miteinander verglichen wurden [109], fertigten wir in unserer Arbeit Helligkeitsprofile vom gesamten im OCT erfassten Gewebe an. Vorteilhaft daran ist, dass man im Gegensatz zu einer eher „statischen“ Helligkeitsmessung in einem einzelnen Abschnitt ein in gewisser Weise „dynamisches“ Helligkeitsprofil über die gesamte Gewebedicke betrachtet. Erfahrungsgemäß erhält man aus dem Profilverlauf, zusätzlich zu den Helligkeitswerten, nützliche Information zur Unterscheidung der verschiedenen Gewebehistologien. Es wäre daher aus unserer Sicht sinnvoll sowohl die absoluten Helligkeitswerte als auch den Profilverlauf in einem Computer-Algorithmus zur Beurteilung von OCT-Bildern zu verarbeiten. Weiterhin konnten wir in unserer Arbeit zeigen, dass es durch die Applikation von Essigsäure zu einer Akzentuierung der von der Gewebehistologie abhängigen Helligkeitsunterschiede kommt und dass es folglich im klinischen Alltag durchaus sinnvoll wäre die OCT Untersuchung im Anschluss an die Applikation von Essigsäure durchzuführen.

5.2.4 Diskussion der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile für DMSO und PEG

Durch die quantitative Analyse anhand der mittleren Helligkeits- sowie der entsprechenden Differenzprofile konnte in unserer Arbeit gezeigt werden, dass sich sowohl die Applikation von DMSO als auch die von PEG positiv auf die optischen Eigenschaften des von uns untersuchten mehrschichtig unverhornten Plattenepithels der Zervix auswirken. Dabei nahmen die OCA Einfluss auf die Lichtstreuung und Absorption des von der Superlumineszenzdiode des OCT generierten nahen Infrarotlichts was vorwiegend die Helligkeit, aber auch den Kontrast, sowie die Lichteindringtiefe in das Gewebe beeinflusste. Der Einfluss von Clearingmitteln wurde bereits in zahlreichen Studien anhand von Messungen der Rückstreuung und Durchlässigkeit des Lichts im Gewebe in vitro und in vivo ermittelt. Zumeist wurde dabei der Erfolg der Clearingmittel anhand der erhöhten Lichtdurchlässigkeit, sowie der verminderten Reflexion gemessen [112, 121]. Für die Bildgebung mittels der OCT ist es jedoch von Bedeutung, dass das Licht an den gewünschten Gewebekomponenten weiterhin reflektiert wird um mit dem Licht aus dem Referenzarm zu interferieren und ein Bild zu generieren.

In einer Arbeit von Wang R. K. zur Signalabschwächung durch die Mehrfachstreuung in der OCT werden mehrere Arten von Lichtstreuung beschrieben: einerseits die least scattered photons (LSP), welche selten aber an den zur Bildgebung beitragenden Strukturen reflektiert wurden und andererseits die multiple scattered photons (MSP), welche häufig und an mehreren Gewebekomponenten hintereinander reflektiert wurden. Die LSP tragen maßgeblich zur Bildgebung in der OCT bei, da sie von den zur Untersuchung beabsichtigten Gewebestrukturen geordnet reflektiert wurden. Durch ihre geordnete Reflexion und der darauffolgenden Interferenz mit dem Lichtstrahl aus dem Referenzarm entsteht ein brauchbares Interferenzmuster, während es durch die ungeordnete Mehrfachstreuung (MSP) zu einer Verschlechterung des detektierten Signals kommt [116].

Die statistische Auswertung der mittleren Differenzprofile zeigte, dass die Effekte der OCA auf das Gewebe vielmehr durch Trends im Sinne von konstanten, überzufällig langen Folgen von Image points mit ähnlichen Helligkeitsdifferenzwerten als durch die absoluten Größen der Helligkeitsdifferenzen an sich charakterisierbar sind. Dieses Ergebnis unterstreicht die Beobachtung aus der qualitativen Analyse, dass es sich bei den durch DMSO und PEG erwirkten Effekten um eher kleine handelt, zeigt aber auch auf, dass Effekte wenn auch nur klein, tatsächlich vorhanden sind. Betrachtet man die mittleren Helligkeits- und

Differenzprofile für DMSO und PEG (s. S. 90-96, Abb. 45 bis 50), so fällt auf, dass sich weder durch die Applikation von DMSO noch von PEG ein über alle Image points konstanter Effekt zeigt. Stattdessen zeigte sich je nach angewandtem OCA, Einwirkdauer, Befundkategorie des Präparats und Image point-Bereich entweder eine verstärkende oder inhibierende Wirkung auf die Helligkeit die besonders im Epithel, je nach Gewebeveränderung, sehr unterschiedlich ausfallen konnte. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich die dysplastischen Hauptveränderungen im nicht invasiven Stadium vorwiegend im Epithel abspielen. So hat DMSO über die gesamte Epitheldicke in Normalgewebe (s. S. 89, Tab. 14 und S. 90, Abb. 45) bereits ab 5 Minuten nach Applikation eine die Helligkeit verstärkende, während PEG hier auf den oberen Epithelbereich (s. S. 94, Abb. 48, Image points 0-20) eine inhibierende und auf den unteren Epithelbereich (s. S. 94, Abb. 48, Image points 20-50) eine verstärkende Wirkung für die Einwirkdauer von 5 Minuten aufweist (s. S. 93, Tab. 15. Signifikanz lediglich für die Differenzkurven d5-n, d10-d5 und d20-d10). Im Falle von Entzündungsgewebe (Inflammation) zeigte sich durch PEG wiederum eine signifikante Helligkeitszunahme über den gesamten Epithelbereich ab einer Einwirkdauer von 10 Minuten (s. S. 93, Tab. 15 und S. 95, Abb. 49). Wurde DMSO auf einem Präparat mit einer CIN 2 appliziert, so variierten die Effekte auf die Helligkeit stark, je nach Einwirkdauer und Gewebeabschnitt. Nach einer Einwirkdauer von 5 Minuten zeigte sich ein inhibierender Effekt auf das obere Epithel (s. S. 91, Abb. 46, Image points 0-20), während im darunterliegenden Gewebe für dieselbe Einwirkdauer die Helligkeitszunahme dominierte. Nach 10-minütiger Einwirkdauer zeigte sich ein Effekt, im Sinne einer Helligkeitszunahme, überhaupt erst im unteren Epithel. Die Applikation der OCA auf Präparate die eine CIN 3 aufwiesen hatte sowohl nach DMSO als auch nach PEG Applikation eine signifikant die Helligkeit verstärkende Wirkung über das gesamte Zeitintervall von 5-20 Minuten zur Folge (s. S. 92, Abb. 47), bis auf den Unterschied, dass sich dieser Effekt nach PEG Applikation erst ab dem Image point von 10 zeigte (s. S. 96, Abb. 50). Im Stroma kam es durch die Applikation der OCA bei den CIN 2- und CIN 3-Befunden zu einer Helligkeitszunahme in der Tiefe (s. S. 91-92, Abb. 46-47 und S. 96, Abb. 50), während PEG bei den Normalbefunden und den Inflammationen eine Helligkeitsabnahme bewirkte (s. S. 94-95, Abb. 48-49). Die Wirkung des DMSO auf das Stroma bei den Normalbefunden zeigte sich vernachlässigbar gering (s. S. 90, Abb. 45).

Vergleicht man die Agenzien untereinander, so fällt auf, dass die Helligkeitszunahme unter der Einwirkung der OCA deutlich geringer ausfällt im Vergleich zu der nach Applikation von Essigsäure. Dies verdeutlicht nochmals, dass jedes Agens in unterschiedlichem Maße mit dem

Gewebe interagiert und dementsprechend auch die optischen Lichteigenschaften anders verändert. Insgesamt erscheinen die Effekte des PEG auf die OCT in Bezug auf die Helligkeit, den Kontrast sowie die Tiefe gegenüber derer nach DMSO-Applikation etwas stärker ausgeprägt, was an der größeren Spanne der Differenzwerte für PEG gegenüber DMSO in den mittleren Differenzprofilen erkennbar ist (s. S. 90-96, Abb. 45-50, rechts). Eine von Choi et al. an menschlicher Haut durchgeführte in vitro Studie zeigte, dass weniger der Brechungsindex und die Osmolalität, sondern vielmehr die Anzahl der Hydroxylgruppen für das optische Clearing ausschlaggebend ist [120]. Dieses Ergebnis wurde durch die Arbeit von Mao et al. bestätigt, in der das Ausmaß der Lichtdurchlässigkeit nach Applikation von sechs OCA aus der Gruppe der Alkohole untersucht wurde. Dort zeigte sich, dass der optische Clearingeffekt mit zunehmender Anzahl an Hydroxylgruppen stärker ausgeprägt und damit für den dreiwertigen Alkohol Glycerol am höchsten war, gefolgt von den zweiwertigen Alkoholen wie beispielsweise PEG [121]. Die Wirkung ist höchstwahrscheinlich auf die gute Gewebegängigkeit, sowie auf die reversible Interaktion mit den Kollagenfibrillen durch die Hydroxylgruppen aufweisenden OCA zurückzuführen [117, 121]. Da DMSO im Gegensatz zu PEG zu den organischen Lösungsmitteln gehört und keine Hydroxylgruppe besitzt könnte dies teilweise die von uns beobachteten stärkeren Effekte durch die PEG-Applikation erklären, wobei DMSO als sog. „Penetration Enhancer“ ebenfalls über eine äußerst gute Gewebegängigkeit verfügt [117]. DMSO hat sich als ein effektives Clearingmittel herausgestellt, insbesondere wenn es um die schnelle Verbesserung der Lichteindringtiefe geht [112]. Dies ist ein wichtiger Parameter, da das optische Clearing letztendlich die Verbesserung der Diagnostik optischer Methoden direkt am Patienten zum Ziel hat und dem Untersucher damit nicht unbegrenzt viel Zeit zur Einwirkung der Agenzien zur Verfügung steht. Auch in unserer Studie zeigten sich die Effekte unter DMSO im Gegensatz zu PEG immer bereits ab der kürzesten Einwirkdauer von 5 Minuten (s. S. 89, Tab. 14 und S. 93, Tab. 15). Eine andere in vivo Studie an mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel der Mundschleimhaut von Hamstern zeigte, dass DMSO als Clearingmittel gegenüber Glycerol weitaus effektiver ist [119]. Dies wurde aufgrund der histologischen Ähnlichkeit zum zervikalen Epithel bei der Auswahl der OCA von uns berücksichtigt. Allerdings ist als Nachteil von DMSO zu erwähnen, dass es aufgrund seiner Toxizität zur Anwendung am Patienten sehr umstritten ist und im Gegensatz zu PEG keine Zulassung durch die FDA besitzt. Da die zuletzt an DMSO durchgeführten toxikologischen Untersuchungen jedoch schon relativ alt sind, wären für eine Entscheidungsfindung laut FDA noch zusätzliche und

genauere Untersuchungen bezüglich der Wirkung und des Risikoprofils von DMSO nötig [118, 146].

Einer der zentralen Erkenntnispunkte aus der Analyse der mittleren Helligkeitsprofile und der zugehörigen mittleren Differenzprofile ist, dass die beobachteten Effekte sich höchstwahrscheinlich in Abhängigkeit zueinander aus dem Zusammenspiel verschiedener Faktoren ergeben. Bei diesen Faktoren handelt es sich zum einen wie erwartet um die durch uns festgelegten Bedingungen wie dem applizierten Agens und der Einwirkzeit, sowie zum anderen um die durch uns nicht steuerbare Zugehörigkeit des Gewebes zu einer der verschiedenen Befundkategorien (in unserem Fall: Normalbefund, Inflammation, CIN 2 und CIN 3) oder ganz allgemein ausgedrückt der histologischen Beschaffenheit des untersuchten Präparates. Zu Beginn unserer Studie gingen wir von einer intern konstanten Wirkung der einzelnen Clearingmittel aus und erwarteten gewisse von der Einwirkdauer abhängige Variationen daher lediglich in der Ausprägungsstärke der Effekte. Die Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile hat jedoch gezeigt, dass die durch die OCA hervorgerufenen Effekte nicht schlichtweg additiv sind, was einen vom untersuchten Gewebe unabhängigen und konstanten Effekt implizieren würde. Dies bedeutet, dass ein und dasselbe Agens in Abhängigkeit von der Einwirkdauer auf unterschiedliche histologische Gewebeformationen appliziert durchaus zueinander entgegengesetzte Wirkungen haben kann. In unserer Arbeit hat sich sogar gezeigt, dass die Wirkung eines Agens innerhalb eines einzelnen Präparats variieren und spezifisch nur in einem bestimmten Bereich von Image points auftreten kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich beim optischen Clearing um einen komplexen und noch nicht verstandenen Mechanismus zur Verbesserung der optischen Lichteigenschaften von nicht transparentem Gewebe handelt. Das Clearing beruht dabei auf mehreren unterschiedlichen Vorgängen und hängt von mehreren Faktoren wie der Gewebeart, dem Gewebeabschnitt, der Einwirkdauer und dem Clearingmittel ab. Zum besseren Verständnis und der damit verbundenen Verbesserung der Clearingmethode sind weiterführende Untersuchungen nötig. Von besonderem Interesse sind dabei auch in vivo Modelle, da die Clearingmittel sich unter physiologischen Bedingungen evtl. auch anders verhalten könnten. Die Kombination aus dem optischem Clearing zusammen mit den verschiedenen auf Licht basierenden Methoden wie beispielsweise der OCT stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Diagnostik in nicht transparentem Gewebe dar und sollte in Zukunft weiterverfolgt werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Optische Kohärenztomographie (OCT) ist eine auf Licht im nahen Infrarotbereich basierende optische Methode, welche die nicht invasive Betrachtung von Gewebe in der Tiefe als sog. optische Biopsie ermöglicht. Die Methode hat sich seit ihrer Entwicklung für medizinische Zwecke durch Fujimoto et al. im Jahre 1991 rasant weiterentwickelt und als klinische Untersuchungsmethode in der Ophthalmologie etabliert [96, 98]. Die Anwendung der OCT außerhalb der Ophthalmologie zur Betrachtung von optisch nicht transparentem Gewebe wie beispielsweise der Zervix ist klinisch von großem Interesse und Gegenstand aktueller Forschung. Ein limitierender Faktor des Verfahrens ist die absorptions- und streuungsbedingte geringe Eindringtiefe des Lichts in das Gewebe. Die Verbesserung der optischen Eigenschaften von nicht transparentem Gewebe durch sog. optische Clearingmittel (optical clearing agents, OCA) stellt eine potentielle Lösung dieses Problems dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen der in der Gynäkologie routinemäßig angewandten Essigsäure sowie der in der Literatur vorbeschriebenen optischen Clearingmittel DMSO und PEG auf die optische Kohärenztomographie in der Beurteilung des Zervixepithels. Zur Beantwortung der Fragestellung wurden insgesamt 571 OCT Bilder von 34 Konuspräparaten untersucht. Es wurden sowohl auffällige als auch unauffällige Areale jeweils vor Applikation eines Agens zum Zeitpunkt 0, sowie entsprechend nach 3- und 10-minütiger Einwirkdauer von 6 % Essigsäure oder nach 5-, 10- und 20- minütiger Einwirkdauer von DMSO oder PEG erfasst. Die OCT-Bilder die nach der Applikation der Agenzien generiert wurden, wurden zu einem späteren Zeitpunkt den OCT-Bildern desselben Areals vor Applikation gegenübergestellt. Sie wurden dann bezüglich der Veränderungen der drei Kriterien Helligkeit, Kontrast sowie Tiefe miteinander verglichen und mithilfe eines standardisierten Schemas bewertet. Die Verteilung der subjektiven Urteile bezüglich Abnahme oder Zunahme der zu bewertenden Kriterien wurde anhand eines nicht parametrischen Standardtests für die Prüfung auf Gleichverteilung mehrerer Anteile statistisch ausgewertet. Weiterhin wurden die mittels OCT erfassten Areale zu einem späteren Zeitpunkt mit dem histopathologischen Befund desselben Areals verglichen und die prozentuale Übereinstimmungsrate zwischen der OCT und der Histologie ermittelt. Zusätzlich zu der qualitativen Analyse fand auch eine quantitative Analyse anhand der Bestimmung mittlerer Helligkeits- und Differenzprofile für die Befundgruppen der Normalbefunde, CIN 2, CIN 3 und Inflammationen statt. Anhand dieser mittleren Differenzprofile konnten die Auswirkungen von Essigsäure, DMSO und PEG quantitativ

dargestellt und ausgewertet werden. Es wurde postuliert, dass bei Zutreffen der Nullhypothese im Falle einer fehlenden Auswirkung auf die OCT-Bilder durch die applizierten Agenzien die mittleren Differenzkurven ohne signifikante Abweichung von der Nulllinie um eben diese Linie fluktuieren müssten. Diese Hypothese wurde für die Essigsäuregruppe mittels des KPSS-Test und für die DMSO- bzw. PEG-Gruppe anhand des Runs-, des Hotelling T2- sowie des ADF-Tests statistisch überprüft.

In der vorliegenden prospektiven ex vivo Studie konnte durch die qualitative und quantitative Analyse der insgesamt 571 OCT-Bilder Folgendes gezeigt werden:

1. Es konnte durch die Applikation der von uns untersuchten Agenzien auf das Gewebe kein signifikanter Einfluss auf die Übereinstimmungsrate zwischen OCT-Befund und dem histopathologischen Befund beobachtet werden.
2. Die der OCT-Untersuchung vorausgehende Applikation von Essigsäure hat eine Auswirkung auf die Bildqualität. Die visuell qualitative Analyse ergab für die Normalbefunde, Inflammationen und CIN 3 zusammengefasst eine signifikante Zunahme der Helligkeit. Diese trat für die Normalbefunde und CIN 3 ab einer Einwirkzeit von 3 Minuten ein und nahm zeitabhängig weiter zu, während sie bei den Inflammationen ab 10 Minuten Einwirkzeit als signifikant besser beurteilt wurde. Weniger eindeutig zeigten sich die Auswirkungen auf die Tiefe und den Kontrast. Eine signifikante Tiefenzunahme zeigte sich für die Normalbefunde nach 10 Minuten. Für die CIN 3 nahm die Tiefe nach 3 Minuten hingegen signifikant ab. Der Kontrast verschlechterte sich nach Essigsäureapplikation insgesamt und wurde bei den Normalbefunden nach 10-minütiger Einwirkdauer als signifikant schlechter beurteilt.
3. Die qualitative Analyse konnte durch die quantitative Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile nach Essigsäureapplikation bestätigt werden. Die Normalbefunde zeigten bereits nach 3 Minuten eine signifikante Helligkeitszunahme über das gesamte Gewebe, die sich zeitabhängig weiter verstärkte. In der CIN 3-Gruppe kam es ab 3 Minuten Einwirkzeit zu einer signifikanten Helligkeitszunahme im Epithel und im darunterliegenden Stroma zu einem Helligkeitsabfall. Für die Inflammationen zeigte sich nach 3 Minuten eine maximale Helligkeitszunahme im Epithel, die mit zunehmender Einwirkzeit wieder abnahm.
4. Nach Applikation der Clearingmittel DMSO bzw. PEG wurde in der qualitativen Analyse durch die Untersucher eine signifikante Verbesserung der Helligkeit, Tiefe

und des Kontrasts festgestellt. Dieser Effekt setzte in den meisten Fällen nach 5 Minuten ein und fiel für PEG stärker aus als für DMSO. Ausnahmen davon bildeten die Tiefe bei den Normalbefunden und der Kontrast bei CIN 3 nach DMSO, sowie die Helligkeit bei CIN 3 und die Tiefe bei den Inflammationen und CIN 3 nach PEG. In diesen Fällen zeigte sich eine signifikante Verbesserung nach 10 Minuten. Die Kontrast- und Tiefenzunahme in der CIN 2-Gruppe nach DMSO, stellte sich für alle untersuchten Einwirkzeiten als nicht signifikant heraus.

5. Die quantitative Analyse der mittleren Helligkeits- und Differenzprofile von DMSO und PEG zeigte komplexe Auswirkungen auf die Signalintensität der OCT in Abhängigkeit des Clearingmittels, der Einwirkdauer, der Gewebeveränderung und der Gewebetiefe. Dies lässt auf eine komplexe und noch unverstandene Interaktion zwischen den OCA, den Zellbestandteilen und dem umliegenden Medium schließen.
6. Die Analyse der mittleren Differenzprofile nach Applikation von DMSO zeigte bereits ab 5 Minuten eine zeitabhängige Helligkeitszunahme im Epithel für die Normalbefunde und über das gesamte Gewebe für die CIN 3-Befunde. Bei den CIN 2-Befunden nahm die Helligkeit ab dem unteren Epithelbereich zu, nach einer anfänglichen Helligkeitsabnahme im oberen Epithel unter 5-minütiger Einwirkzeit.
7. Unter Einwirkung von PEG kam es für die Normalbefunde nach 5 Minuten zu einer signifikanten Helligkeitsabnahme im oberen Epithelbereich und nachfolgend zu einer Helligkeitszunahme. Bei den Inflammationen zeigte sich ab 10 Minuten eine signifikante Helligkeitszunahme im Epithel, sowie eine Helligkeitsabnahme im darunterliegenden Stroma. Die CIN 3-Befunde zeigten eine über das gesamte Gewebe konstante Helligkeitszunahme für alle untersuchten Einwirkzeiten.

Die optische Kohärenztomographie hat sich in der Gynäkologie als zusätzliches Hilfsmittel zur Kolposkopie für die Detektion der zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN 1-3) und des Plattenepithelkarzinoms in zahlreichen Studien als hilfreich erwiesen. Bis zum Einsatz der OCT im klinischen Alltag sind jedoch noch weitere Verbesserungen der Methode notwendig. Das optische Clearing stellt einen potentiell vielversprechenden Ansatz dar, was durch die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigt werden konnte. Ein besseres Verständnis der Clearingvorgänge in zervikalem Epithel, sowie der für den Clearingerfolg erforderlichen genauen Konzentrationen und Einwirkzeiten der Agenzien in Kombination mit technisch weiter fortgeschrittenen OCT-Geräten sind unabdingbar. Dafür bedarf es weiterer Untersuchungen an ex vivo und in vivo Modellen.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entwicklung und Progression der Zervixdysplasie und molekulare Mechanismen. Leicht modifiziert nach Woodman et al. [20].....	12
Abb. 2: Elimination, Persistenz und Progression karzinogener HPV Infektionen [24].....	14
Abb. 3: Altersstandardisierte Neuerkrankungsrate (Weltstandard) des Zervixkarzinoms pro 100 000 pro Jahr, weltweit, Daten der International Agency for Research on Cancer (IARC) [37].	16
Abb. 4: Rohe Inzidenzrate pro 100 000 Einwohner in Deutschland. Altersgruppen 0-85+, Jahre 1999-2012, Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) am Robert Koch-Institut (RKI) [43].....	17
Abb. 5: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten (Europastandard) pro 100 000 (links) und absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle (rechts) in Deutschland 1999 bis 2012, Daten der deutschen Krebsregister [41].	18
Abb. 6: Tumorstadienverteilung (TNM-Klassifikation) bei Erstdiagnose, Deutschland, 2011-2012, Daten der deutschen Krebsregister [41].	19
Abb. 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Konisationspräparaten aus dem eigenen Institut in H.E Färbung. a) normales mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel bestehend aus der Superfizialzellschicht (1), Intermediärzellschicht (2), Parabasalzellschicht (3) und Basalzellschicht (4), sowie b) CIN 1, c) CIN 2, d) CIN 3 und e) invasives Plattenepithelkarzinom. Die Basalzellschicht ist in a-d gut sichtbar, während sie in e durchbrochen wurde.....	31
Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Konisationspräparat aus dem eigenen Institut. Immunhistochemischer Nachweis einer CIN 1 durch zytoplasmatische und nukleäre p16 Positivität im basalen Epithelabschnitt.	31
Abb. 9: Vereinfachte schematische Darstellung des technischen Prinzips der Time-Domain-OCT (TD-OCT) modifiziert nach Gallwas et al., (Ultrasound Obstet Gynecol. 2010 Nov; 36(5), S.625, Fig. 1) [94].....	32
Abb. 10: Darstellung von gesundem zervikalem Plattenepithel mittels OCT (a) und entsprechender Histologie (b). Roter Pfeil: Superfizialzellschicht, grüner Pfeil: Intermediär- und Parabasalzellschicht, gelber Pfeil: Epithel/Stroma-Grenze, indirekt die Basalmembran. OCT-Bild sowie Histologie aus dem eigenem Studienkollektiv. Der weiße Balken im OCT-Bild dient als Maßstab und entspricht 1 mm.	36
Abb. 11: a) Imalux Niris® TD-OCT Modell, Bildschirm und Tastatur, b) Optische Sonde (Niris®Imaging System) in steriler Einmalhülle (Niris®Probe Sheath).....	42

Abb. 12: Intraoperative Spiegeleinstellung der Portio in nativ (links) sowie nach dem Auftragen von Lugol'scher Lösung (rechts). Die Histologie ergab eine CIN 3 Läsion bei 12 Uhr, sowie in den Quadranten 3-6 und 6-9 Uhr.	45
Abb. 13: Auf einer Korkplatte fixiertes Konuspräparat, a) zu Beginn der Untersuchung, b) mit Papierkreisen zur Markierung der untersuchten Stelle, mit Nadelmarkierungen für die histopathologische Untersuchung von oben c) und von der Seite d) betrachtet.	46
Abb. 14: Darstellung der verwendeten Ratingskala.	48
Abb. 15: Dichotomisierung der Ratingskala in eine Abnahme- (-) sowie in eine Zunahmegruppe (+).	49
Abb. 16: Erstellung eines Helligkeitsprofils aus einem OCT Bild. Links: OCT Querschnittsaufnahme aus gesundem zervikalen Plattenepithel. Das gelb markierte Areal stellt den Bereich dar, aus dem das Helligkeitsprofil erstellt wird. Rechts: Axiales Helligkeitsprofil aus den gemittelten Helligkeitswerten der Pixel einer horizontalen Reihe (Image point).	51
Abb. 17: OCT-Bild eines Normalbefunds (mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel) mit der dazu entsprechenden Histologie rechts. Roter Pfeil: Superficialzellschicht, grüner Pfeil: Intermediär- und Parabasalzellschicht, gelber Pfeil: Epithel/Stroma-Grenze, indirekt die Basalmembran, blauer Pfeil: Stroma, Sternmarkierung: Blutgefäß im Stroma.	59
Abb. 18: OCT-Bild einer Inflammation mit der dazu entsprechenden Histologie rechts.	60
Abb. 19: OCT-Bild von Zylinderepithel mit der dazu entsprechenden tuschemarkierten Histologie rechts.	61
Abb. 20: OCT-Bild einer CIN 1 mit der dazu entsprechenden Histologie rechts.	61
Abb. 21: OCT-Bild einer CIN 2 mit der dazu entsprechenden Histologie rechts.	62
Abb. 22: OCT-Bild einer CIN 3 mit der dazu entsprechenden Histologie rechts.	63
Abb. 23: OCT-Bilder eines Normalbefunds vor (a), sowie nach 3- (b) und 10-minütiger (c) Essigsäureapplikation.	65
Abb. 24: OCT-Bilder einer Inflammation vor (a), sowie nach 3- (b) und 10-minütiger (c) Essigsäureapplikation.	66
Abb. 25: OCT-Bilder einer CIN 3 vor (a), sowie nach 3- (b) und 10-minütiger (c) Essigsäureapplikation.	67
Abb. 26: Häufigkeitsverteilung der Rating-Urteile der OCT-Bilder in der Essigsäuregruppe für die Befundgruppen Normalbefund, Inflammation und CIN 3 (von oben nach unten). Rechts: Nach Dichotomisierung der Urteile (n) für die Kategorien (Kat.) Helligkeit (H),	

Kontrast (K) und Tiefe (T) in eine Abnahme- (-) und eine Zunahmegruppe (+), wurde jeweils der p -Wert für die Einwirkdauer von 3 und 10 Minuten berechnet. Links: Entsprechende Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Form von Barplots.	68
Abb. 27: OCT-Bilder eines Normalbefunds vor (a), sowie nach 5- (b), 10- (c) und 20-minütiger (d) Applikation von DMSO.	70
Abb. 28: OCT-Bilder einer CIN 2 vor (a), sowie nach 5- (b), 10- (c) und 20-minütiger (d) Applikation von DMSO.	71
Abb. 29: OCT-Bilder einer CIN 3 vor (a), sowie nach 5- (b), 10- (c) und 20-minütiger (d) Applikation von DMSO.	72
Abb. 30: Häufigkeitsverteilung der Rating-Urteile der OCT-Bilder in der DMSO-Gruppe für die Befundgruppen der Normalbefunde, CIN 2 und CIN 3 (von oben nach unten). Rechts: Nach Dichotomisierung der Urteile (n) für die Kategorien (Kat.) Helligkeit (H), Kontrast (K) und Tiefe (T) in eine Abnahme- (-) und eine Zunahmegruppe (+), wurde jeweils der p -Wert für die Einwirkdauer von 5, 10 und 20 Minuten berechnet. Links: Entsprechende Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Form von Barplots.....	73
Abb. 31: OCT-Bilder eines Normalbefunds vor (a), sowie nach 5- (b), 10- (c) und 20-minütiger (d) Applikation von PEG.	75
Abb. 32: OCT-Bilder einer Inflammation vor (a), sowie nach 5- (b), 10- (c) und 20-minütiger Applikation von PEG.	76
Abb. 33: OCT-Bilder einer CIN 3 vor (a), sowie nach 5- (b), 10- (c) und 20-minütiger (d) Applikation von PEG.	77
Abb. 34: Häufigkeitsverteilung der Rating-Urteile der OCT-Bilder in der PEG-Gruppe für die Befundgruppen der Normalbefunde, Inflammation und CIN 3 (von oben nach unten). Rechts: Nach Dichotomisierung der Urteile (n) für die Kategorien (Kat.) Helligkeit (H), Kontrast (K) und Tiefe (T) in eine Abnahme- (-) und eine Zunahmegruppe (+), wurde jeweils der p -Wert für die Einwirkdauer von 5, 10 und 20 Minuten berechnet. Links: Entsprechende Darstellung der Häufigkeitsverteilung in Form von Barplots.....	78
Abb. 35: OCT-Bild eines Normalbefunds (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).....	79
Abb. 36: OCT-Bild einer Inflammation (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).	80
Abb. 37: OCT-Bild einer CIN 1 (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).	81
Abb. 38: OCT-Bild einer CIN 2 (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).	81

Abb. 39: OCT-Bild einer CIN 3 (links) mit dem zugehörigen Helligkeitsprofil (rechts).	82
Abb. 40: Helligkeitsprofile eines Normalbefunds und einer Inflammation (links), sowie einer CIN 1-3 (rechts).	82
Abb. 41: Profilplots der Helligkeitswerte der mittleren Helligkeitsprofile von links nach rechts für die „neutral“ Bedingung auf der Abszisse, gegen die 3 Minuten und 10 Minuten Essigsäureeinwirkzeit auf der Ordinate, sowie ganz rechts der 3 Minuten (Abszisse) gegen die 10 Minuten Essigsäureeinwirkzeit (Ordinate).....	85
Abb. 42: Mittlere Helligkeitsprofile der Normalbefunde vor (neutral) sowie nach 3 und 10 Minuten Essigsäureeinwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.	86
Abb. 43: Mittlere Helligkeitsprofile der Inflammationen vor (neutral) sowie nach 3 und 10 Minuten Essigsäureeinwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.	87
Abb. 44: Mittlere Helligkeitsprofile der CIN 3 Befunde vor (neutral) sowie nach 3 und 10 Minuten Essigsäureeinwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.	88
Abb. 45: Mittlere Helligkeitsprofile der Normalbefunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten DMSO-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.	90
Abb. 46: Mittlere Helligkeitsprofile der CIN 2 Befunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten DMSO-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.	91
Abb. 47: Mittlere Helligkeitsprofile der CIN 3 Befunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten DMSO-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.	92
Abb. 48: Mittlere Helligkeitsprofile der Normalbefunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten PEG-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.	94
Abb. 49: Mittlere Helligkeitsprofile der Inflammationen vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten PEG-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.	95
Abb. 50: Mittlere Helligkeitsprofile der CIN 3 Befunde vor (neutral) sowie nach 5, 10 und 20 Minuten PEG-Einwirkung (links). Die zugehörigen mittleren Differenzprofile sind rechts dargestellt.	96

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifikationen zur histologischen und zytologischen Einteilung der Zervixdysplasie [18, 19].	11
Tab. 2: Natürlicher Verlauf der verschiedenen Zervixdysplasiegrade [21, 22].	13
Tab. 3: Einteilung der HP-Viren und zugehörige Subtypen [49, 50].	20
Tab. 4: Ausschnitt aus der gynäkologischen Zytodiagnostik nach der III. Münchner Nomenklatur und entsprechende Empfehlungen [18].	23
Tab. 5: Indikation zur Kolposkopie laut Empfehlungen der AG-CPC (2015) [8, 70].	27
Tab. 6: Ausschnitt aus der kolposkopischen Nomenklatur der Cervix uteri. IFCPC (2011) [75].	29
Tab. 7: Stoffgruppe, Strukturformel, Konzentration, Form/Farbe sowie Hersteller der verwendeten Agenzien.	43
Tab. 8: Zusammenfassung der Befunde aller Studienteilnehmerinnen nach Agens-Gruppe aufgetrennt.	56
Tab. 9: Fallzahlen pro Agens-Gruppe.	57
Tab. 10: Histologische Befunde der mittels OCT untersuchten Stellen, nach Agens aufgetrennt.	57
Tab. 11: Übersicht über die Fallzahlen je nach Analyse. Norm.= Normalbefund, Inflamm.= Inflammation.	58
Tab. 12: Korrelation der Befunde zwischen OCT und Histologie vor und nach Essigsäureapplikation.	64
Tab. 13: Ergebnisse des KPSS-Tests für die mittleren Differenzprofile der Essigsäuregruppe.	84
Tab. 14: <i>p</i> -Werte des Hotelling's T ² - Tests (Hot) und Augmented Dickey-Fuller-Tests (ADF) für DMSO.	89
Tab. 15: <i>p</i> -Werte des Hotelling's T ² (Hot) und des Augmented Dickey-Fuller-Tests (ADF) für PEG.	93

9. Literaturverzeichnis

1. Aumüller, G., G. Aust, and A. Doll, *Duale Reihe Anatomie*. 2010, Georg Thieme Verlag KG: [s.l.].
2. Zemlyn, S., *The length of the uterine cervix and its significance*. J Clin Ultrasound, 1981. **9**(6): p. 267-9.
3. Haag, P., N. Hanhart, and M. Müller, *Gynäkologie und Urologie*. 6 ed. 2012/2013, Breisach am Rhein: Medizinische Verlags- und Informationsdienste.
4. Welsch, U. and T. Deller, *Sobotta Lehrbuch Histologie Unter Mitarbeit von Thomas Deller*. 2011, Urban Fischer Verlag - Lehrbücher: [s.l.].
5. Schmidt-Matthiesen, h. and W. D., *Gynäkologie und Geburtshilfe, Lehrbuch für Studium und Praxis*. 10 ed. 2005, Stuttgart, New York: Schmidt-Matthiesen,h.; Wallwiener D.
6. Stauber, T.W.M., *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2007, Georg Thieme Verlag KG: [s.l.].
7. Feichter, G. and P. Dalquen, *Zytopathologie*. 2000: Springer-Verlag GmbH.
8. Kuhn, W., *[Colposcopy in the diagnosis of early cervical cancer]*. Pathologe, 2011. **32**(6): p. 497-504.
9. Kühn, W. and J. Heinrich, *Kolposkopie in Klinik und Praxis*, in *Frauenärztliche Taschenbücher*. 2011, De Gruyter: Berlin ;Boston.
10. Bubendorf, L., et al., *Pathologie: Zytopathologie*. 2011, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
11. Klöppel, G., et al., *Pathologie ; Bd.: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*. 3 ed. 2013, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH
12. Stoler, M., C. Bergeron, T.J. Colgan, et al., *Squamous cell tumours and precursors, in WHO Classification of Tumours of the Female Reproductive Organs*. 2014, IARC.
13. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF):Konsultationsfassung: Prävention des Zervixkarzinoms, Langversion, 2016, AWMF Registernummer: 015/027OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Zugriff am: 31.07.2016).*
14. Richart, R.M., *Influence of diagnostic and therapeutic procedures on the distribution of cervical intraepithelial neoplasia*. Cancer, 1966. **19**(11): p. 1635-8.
15. *The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop*. JAMA, 1989. **262**(7): p. 931-4.
16. Richart, R.M., *A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia*. Obstet.Gynecol., 1990. **75**(1): p. 131-133.
17. Meigs, J.V., *The vaginal smear: Practical applications in the diagnosis of cancer of the uterus*. Journal of the American Medical Association, 1947. **133**(2): p. 75-78.

18. H. Griesser, K.M., B. Jordan, W. Kühn, K. Neis, H. H. Neumann, R. Bollmann, B. Pöschel, M. Steiner, U. Schenck, *Gynäkologische Zytodiagnostik der Zervix: Münchner Nomenklatur III*. Frauenarzt, 2013. **54**(11): p. 1042-8.
19. P., H., *Uterusmalignome: Zervixkarzinom Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Tumormanual der Projektgruppe Uterusmalignome (Projektleiter PD Dr.med.Ch.Dannecker) der TU und LMU München, 2004. **3**(ISBN: 978-3-88603-839-8).
20. Woodman, C.B., S.I. Collins, and L.S. Young, *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(1): p. 11-22.
21. P., H., T. C., and e. al, *Epidemiologie und Diagnostik der zervikalen intraepithelialen Neoplasie - Ist das derzeitige Konzept von Screening und Diagnostik der CIN noch aktuell?* Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch, 1997. **37**(4): p. 179-191.
22. Ostor, A.G., *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review*. Int.J.Gynecol.Pathol., 1993. **12**(2): p. 186-192.
23. Jordan, J., et al., *European guidelines for clinical management of abnormal cervical cytology, part 2*. Cytopathology, 2009. **20**(1): p. 5-16.
24. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
25. Chelimo, C., et al., *Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer*. J Infect, 2013. **66**(3): p. 207-17.
26. Burchell, A.N., et al., *Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/52-61.
27. Castle, P.E., et al., *A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica*. J Infect Dis, 2005. **191**(11): p. 1808-16.
28. Dunne, E.F., et al., *Prevalence of HPV infection among females in the United States*. JAMA, 2007. **297**(8): p. 813-9.
29. Plummer, M., et al., *A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion*. J Infect Dis, 2007. **195**(11): p. 1582-9.
30. Rodriguez, A.C., et al., *Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(7): p. 513-7.
31. Saslow, D., et al., *American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2012. **62**(3): p. 147-172.
32. Strickler, H.D., et al., *Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(8): p. 577-86.
33. Pett, M. and N. Coleman, *Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?* J Pathol, 2007. **212**(4): p. 356-67.

34. Woodman, C.B., et al., *Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study*. Lancet, 2001. **357**(9271): p. 1831-6.
35. Peto, J., et al., *The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK*. Lancet, 2004. **364**(9430): p. 249-56.
36. Society of Gynecologic Oncologists Education Resource Panel Writing, g., et al., *Cervical cancer prevention in the era of prophylactic vaccines: a preview for gynecologic oncologists*. Gynecol Oncol, 2006. **102**(3): p. 552-62.
37. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 28/04/2014
38. Bray F, R.J., Masuyer E, Ferlay J, *Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008*. Int J Cancer. 2013 Mar 1;132(5):1133-45. doi: 10.1002/ijc.27711. Epub 2012 Jul 26. .
39. *Krebs in Deutschland 2009/2010*, Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). **9. Ausgabe, Berlin 2013**, S. 80-83.
40. A., S. and D.M.e. al, *Epidemiologie, Ätiologie und Prävention des Zervixkarzinoms*. Gynäkologe, 1999. **32**(4): p. 247-260.
41. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). **10. Ausgabe, Berlin 2015**, S. 82-85.
42. Cancer, I.I.C.o.H.P.V.H.a.C., *Human Papillomavirus and Related Diseases Germany. Summary Report 3. June 2013*. 2013, World Health Organization.
43. ZfKD; and RKI, *Zentrum für Krebsregisterdaten am Robert Koch Institut, Datenbankabfrage*, Date accessed: 09.03.2016.
44. Beckmann, M., M. Koch, and G. Mehlhorn, *Gebärmutterhalskrebs, Zervixkarzinom*. 2012, Deutsche Krebsgesellschaft (DKG).
45. zur Hausen, H., *Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas*. Curr Top Microbiol Immunol, 1977. **78**: p. 1-30.
46. Boshart, M., et al., *A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer*. EMBO J, 1984. **3**(5): p. 1151-7.
47. Durst, M., et al., *A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3812-5.
48. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
49. Bouvard, V., et al., *A review of human carcinogens--Part B: biological agents*. Lancet Oncol, 2009. **10**(4): p. 321-2.

50. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., G.G., et al., *S3-Leitlinie zur Impfprävention HPV-assoziiierter Neoplasien*. 2013.
51. Bosch, X. and D. Harper, *Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era*. Gynecol Oncol, 2006. **103**(1): p. 21-4.
52. Li, N., et al., *Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication*. Int J Cancer, 2011. **128**(4): p. 927-35.
53. Baseman, J.G. and L.A. Koutsky, *The epidemiology of human papillomavirus infections*. J.Clin.Virol., 2005. **32 Suppl 1**: p. S16-S24.
54. American College of, O. and Gynecologists, *ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists. Number 61, April 2005. Human papillomavirus*. Obstet Gynecol, 2005. **105**(4): p. 905-18.
55. Kiechle, P.D.m.M., *Tumorartige Veränderungen und Tumoren*, in *Gynäkologie und Geburtshilfe*, U.F. Elsevier GmbH, Editor. 2007, Kiechle, Prof. Dr. med Marion: München-Jena. p. 511-518.
56. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
57. Gierisch, J.M., et al., *Oral Contraceptive Use and Risk of Breast, Cervical, Colorectal, and Endometrial Cancers: A Systematic Review*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013.
58. Collins, S., et al., *Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study*. Eur.J.Cancer, 2009.
59. Castellsague, X., et al., *Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners*. N Engl J Med, 2002. **346**(15): p. 1105-12.
60. Mahmud, S.M., et al., *HLA polymorphisms and cervical human Papillomavirus infection in a cohort of Montreal University students*. J Infect Dis, 2007. **196**(1): p. 82-90.
61. Schneider, V., *[Cervical cancer screening in Germany. Current status]*. Pathologe, 2012. **33**(4): p. 286-92.
62. Turkmen, I.C., et al., *Patients with Epithelial Cell Abnormality in PAP Smears: Correlation of Results with Follow-Up Smears and Cervical Biopsies*. Turk Patoloji Derg, 2013. **29**(3): p. 179-184.
63. Abulafia, O., J.C. Pezzullo, and D.M. Sherer, *Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey*. Gynecol.Oncol., 2003. **90**(1): p. 137-144.
64. Vesco, K.K., et al., in *Screening for Cervical Cancer: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force*. 2011: Rockville (MD).
65. Lenhoff, A., *Five FDA-approved HPV assays*. MLO Med Lab Obs, 2012. **44**(7): p. 14, 16, 18.
66. Wentzensen, N., *[Molecular diagnosis of HPV infections]*. Pathologe, 2011. **32**(6): p. 461-6.

67. Wright, T.C., Jr., et al., *Reflex human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in women with abnormal Papanicolaou smears*. Am.J.Obstet.Gynecol., 1998. **178**(5): p. 962-966.
68. (DGGG), L.d.D.G.f.G.u.G., et al., *Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale*. 2008, Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (AWMF).
69. Bauer, H., *Farbatlas der Kolposkopie*. 5., überarb. und erw. Aufl. ed. 1998, Stuttgart [u.a.]: Schattauer. X, 253 S.
70. W. Kühn and F. Giesecking *im Auftrag der Arbeitsgemeinschaft für Kolposkopie und Zervixpathologie (AG-CPC): Die aktuellen Empfehlungen der AG-CPC zur Kolposkopie 2015*. GYN: Praktische Gynäkologie **2015**(5), p.304-320.
71. W.Kühn, et al., *Die aktualisierten Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft für Zervixpathologie und Kolposkopie (AG-CPC) 2013*. GYN: Praktische Gynäkologie, 2013. **2013**(18): p. 46-56.
72. MacLean, A.B., *Acetowhite epithelium*. Gynecol Oncol, 2004. **95**(3): p. 691-4.
73. Maddox, P., et al., *Cytokeratin expression and acetowhite change in cervical epithelium*. J Clin Pathol, 1994. **47**(1): p. 15-7.
74. O'Connor, D.M., *A tissue basis for colposcopic findings*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2008. **35**(4): p. 565-82; viii.
75. Bornstein, J., et al., *2011 colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy*. Obstet Gynecol, 2012. **120**(1): p. 166-72.
76. Ferris, D.G., et al., *Colposcopy quality control for clinical trials: the positive effects from brief, intensive educational intervention*. J Low Genit Tract Dis, 2002. **6**(1): p. 11-6.
77. Ferris, D.G., M. Litaker, and A. Group, *Interobserver agreement for colposcopy quality control using digitized colposcopic images during the ALTS trial*. J Low Genit Tract Dis, 2005. **9**(1): p. 29-35.
78. Ferris, D.G., M.S. Litaker, and A. Group, *Prediction of cervical histologic results using an abbreviated Reid Colposcopic Index during ALTS*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(3): p. 704-10.
79. Gage, J.C., et al., *Number of cervical biopsies and sensitivity of colposcopy*. Obstet Gynecol, 2006. **108**(2): p. 264-72.
80. Hopman, E.H., et al., *Observer agreement on interpreting colposcopic images of CIN*. Gynecol Oncol, 1995. **58**(2): p. 206-9.
81. Schadel, D., et al., *Evaluation of a digital store-and-forward colposcopic system--a pilot study to assess usability for telemedicine*. J Telemed Telecare, 2005. **11**(2): p. 103-7.
82. Sellors, J.W., et al., *Observer variability in the scoring of colpophotographs*. Obstet Gynecol, 1990. **76**(6): p. 1006-8.
83. Sideri, M., et al., *Operator variability in disease detection and grading by colposcopy in patients with mild dysplastic smears*. Cancer, 1995. **76**(9): p. 1601-5.

84. Ballagh, S., *Factors affecting the reproducibility and validity of colposcopy for product development: review of current literature*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2004. **37 Suppl 3**: p. S152-5.
85. Cantor, S.B., et al., *Accuracy of colposcopy in the diagnostic setting compared with the screening setting*. Obstet Gynecol, 2008. **111**(1): p. 7-14.
86. Mitchell, M.F., et al., *Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis*. Obstet Gynecol, 1998. **91**(4): p. 626-31.
87. Strander, B., et al., *The performance of a new scoring system for colposcopy in detecting high-grade dysplasia in the uterine cervix*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2005. **84**(10): p. 1013-7.
88. Baum, M.E., et al., *Colposcopic accuracy of obstetrics and gynecology residents*. Gynecol Oncol, 2006. **103**(3): p. 966-70.
89. Horn, L.C., et al., *[Pathoanatomical preparation and reporting for dysplasias and cancers of the cervix uteri: cervical biopsy, conization, radical hysterectomy and exenteration]*. Pathologie, 2007. **28**(4): p. 249-60.
90. Tsoumpou, I., et al., *p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(3): p. 210-20.
91. Huang, D., et al., *Optical coherence tomography*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1178-1181.
92. Podoleanu, A.G., *Optical coherence tomography*. Br.J.Radiol., 2005. **78**(935): p. 976-988.
93. Fujimoto, J.G., *Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(11): p. 1361-7.
94. Gallwas, J., et al., *Optical coherence tomography as a non-invasive imaging technique for preinvasive and invasive neoplasia of the uterine cervix*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2010. **36**(5): p. 624-9.
95. Drexler, W., et al., *In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography*. Opt.Lett., 1999. **24**(17): p. 1221-1223.
96. Fujimoto, J.G., et al., *Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy*. Neoplasia, 2000. **2**(1-2): p. 9-25.
97. Drexler, W., et al., *Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 502-7.
98. Huang, D., et al., *Optical coherence tomography*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1178-81.
99. Zysk, A.M., et al., *Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside*. J Biomed Opt, 2007. **12**(5): p. 051403.
100. Nguyen, F.T., et al., *Optical coherence tomography: the intraoperative assessment of lymph nodes in breast cancer*. IEEE Eng Med Biol Mag, 2010. **29**(2): p. 63-70.

101. Goldberg, B.D., et al., *Automated algorithm for differentiation of human breast tissue using low coherence interferometry for fine needle aspiration biopsy guidance*. J Biomed Opt, 2008. **13**(1): p. 014014.
102. Sergeev, A., et al., *In vivo endoscopic OCT imaging of precancer and cancer states of human mucosa*. Opt.Express, 1997. **1**(13): p. 432-440.
103. Pitris, C., et al., *High-resolution imaging of gynecologic neoplasms using optical coherence tomography*. Obstet.Gynecol., 1999. **93**(1): p. 135-139.
104. Escobar, P.F., et al., *Diagnostic efficacy of optical coherence tomography in the management of preinvasive and invasive cancer of uterine cervix and vulva*. Int.J.Gynecol.Cancer, 2004. **14**(3): p. 470-474.
105. Gallwas, J., *Die optische Kohärenztomografie als nicht invasives Untersuchungsverfahren in der Beurteilung zervikalen Gewebes - Erste Ergebnisse*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2009. **69**(10): p. 931.
106. Gallwas, J.K., et al., *Optical coherence tomography for the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia*. Lasers Surg Med, 2011. **43**(3): p. 206-12.
107. Drezek, R.A., et al., *Optical imaging of the cervix*. Cancer, 2003. **98**(9 Suppl): p. 2015-2027.
108. Zuluaga, A.F., et al., *Optical coherence tomography: a pilot study of a new imaging technique for noninvasive examination of cervical tissue*. Am.J.Obstet.Gynecol., 2005. **193**(1): p. 83-88.
109. Belinson, S.E., et al., *Cervical epithelial brightness by optical coherence tomography can determine histological grades of cervical neoplasia*. J Low Genit Tract Dis, 2013. **17**(2): p. 160-6.
110. Gallwas, J., et al., *Diagnostic efficacy of backscattering intensity measurements in optical coherence tomography of cervical intraepithelial dysplasia*. Lasers Surg Med, 2012. **44**(1): p. 11-9.
111. Escobar, P.F., L. Rojas-Espaillet, and J.L. Belinson, *Optical diagnosis of cervical dysplasia*. Int.J.Gynaecol.Obstet., 2005. **89**(1): p. 63-64.
112. He, Y. and R.K. Wang, *Dynamic optical clearing effect of tissue impregnated with hyperosmotic agents and studied with optical coherence tomography*. J Biomed Opt, 2004. **9**(1): p. 200-6.
113. Liu, H., et al., *Dependence of tissue optical properties on solute-induced changes in refractive index and osmolarity*. J Biomed Opt, 1996. **1**(2): p. 200-11.
114. Bakutkin, V.V., et al. *Controlling optical properties of sclera*. 1995.
115. Tuchin, V.V., et al., *Light propagation in tissues with controlled optical properties*. J Biomed Opt, 1997. **2**(4): p. 401-17.
116. Wang, R.K., *Signal degradation by multiple scattering in optical coherence tomography of dense tissue: a Monte Carlo study towards optical clearing of biotissues*. Phys Med Biol, 2002. **47**(13): p. 2281-99.

117. Zhu, D., et al., *Recent progress in tissue optical clearing*. Laser Photon Rev, 2013. **7**(5): p. 732-757.
118. Bui, A.K., et al., *Revisiting optical clearing with dimethyl sulfoxide (DMSO)*. Lasers Surg Med, 2009. **41**(2): p. 142-8.
119. Millon, S.R., et al., *Effect of optical clearing agents on the in vivo optical properties of squamous epithelial tissue*. Lasers Surg Med, 2006. **38**(10): p. 920-7.
120. Choi, B., et al., *Determination of chemical agent optical clearing potential using in vitro human skin*. Lasers Surg Med, 2005. **36**(2): p. 72-5.
121. Mao, Z., et al., *Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin in vitro*. J Biomed Opt, 2008. **13**(2): p. 021104.
122. Wen, X., et al., *Enhanced optical clearing of skin in vivo and optical coherence tomography in-depth imaging*. J Biomed Opt, 2012. **17**(6): p. 066022.
123. (IFA), I.f.A.d.D.G.U. Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung [cited 2014 24.01.2014]; Available from: [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/490979.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/490979.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0).
124. Marren, K., *Dimethyl sulfoxide: an effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs*. Phys Sportsmed, 2011. **39**(3): p. 75-82.
125. Farrant, J., et al., *Structural and functional aspects of biological freezing techniques*. J Microsc, 1977. **111**(1): p. 17-34.
126. Veronese, F.M. and G. Pasut, *PEGylation, successful approach to drug delivery*. Drug Discov Today, 2005. **10**(21): p. 1451-8.
127. Gallwas, J., et al., *Validation of an ex vivo human cervical tissue model for optical imaging studies*. Lasers Surg Med, 2012. **44**(3): p. 245-8.
128. Fleiss, J.L., B. Levin, and C.M. Paik, *Statistical methods for rates and proportions*. 3rd ed. 2003, New York: Wiley. xxvii, 760 p.
129. (2003), R.c.T. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <http://www.R-project.org/>.
130. Bortz, J., G.A. Lienert, and K. Boehnke, *Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik*. 1990, Berlin: Springer-Verlag.
131. Johnson, R.A. and D.W. Wichern, *Applied multivariate statistical analysis*. 5. ed ed. 2002, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. XVIII, 767 S.
132. Kwiatkowski, D., et al., *Testing the null hypothesis of stationarity against the alternative of a unit root: How sure are we that economic time series have a unit root?* Journal of Econometrics, 1992. **54**(1-3): p. 159-178.
133. Box, G.E.P., Jenkins, G.M., Reinsel, G.C., *Times series analysis - forecasting and control.*, 1994 London.

134. Trapletti, A., Hornik, K., LeBaron. B. *Package 'tseries' (2014), Time series analysis and computational finance*. 2014; Available from: <http://www.R-project.org/>.
135. Turk, L., *Die optische Kohärenztomographie - ein nicht invasives Untersuchungsverfahren zur Beurteilung von zervikalem Gewebe Validierung einer neuen Methode in vivo*, in *Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität*. 2011: München.
136. Gaschler, R., *Neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Optischen Kohärenztomographie bei der Beurteilung dysplastischer Veränderungen der Cervix Uteri*, in *Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilian Universität* 2014: München.
137. Leitgeb, R., C. Hitzenberger, and A. Fercher, *Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography*. Opt Express, 2003. **11**(8): p. 889-94.
138. Murthy, R.K., et al., *Clinical applications of spectral domain optical coherence tomography in retinal diseases*. Biomed J, 2016. **39**(2): p. 107-20.
139. Gallwas, J., et al., *3D optical coherence tomography of cervical intraepithelial neoplasia--early experience and some pitfalls*. Eur J Gynaecol Oncol, 2012. **33**(1): p. 37-41.
140. Kim, J., et al., *Functional optical coherence tomography: principles and progress*. Phys Med Biol, 2015. **60**(10): p. R211-37.
141. Hinselmann, H., *Die Essigsäureprobe als Bestandteil der erweiterten Kolposkopie*. Deutsche Medizinische Wochenschrift., 1938. **64**(2): p. 40-42.
142. Pogue, B.W., et al., *Analysis of acetic acid-induced whitening of high-grade squamous intraepithelial lesions*. J Biomed Opt, 2001. **6**(4): p. 397-403.
143. Marina, O.C., C.K. Sanders, and J.R. Mourant, *Effects of acetic acid on light scattering from cells*. J Biomed Opt, 2012. **17**(8): p. 085002-1.
144. Zuluaga, A.F., et al., *Contrast agents for confocal microscopy: how simple chemicals affect confocal images of normal and cancer cells in suspension*. J Biomed Opt, 2002. **7**(3): p. 398-403.
145. Drezek, R.A., et al., *Laser scanning confocal microscopy of cervical tissue before and after application of acetic acid*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **182**(5): p. 1135-9.
146. Harter, J.G., *The status of dimethyl sulfoxide from the perspective of the Food and Drug Administration*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1983. **411**(1): p. 1-5.

Publikationen im Rahmen dieser Studie:

Effect of acetic acid on optical coherence tomography (OCT) images of cervical epithelium.

Gallwas J, Stanchi A, Dannecker C, Ditsch N, Mueller S, Mortensen U, Stepp H.
Lasers Med Sci. 2014 Nov;29(6):1821-8. doi: 10.1007/s10103-014-1581-9. Epub 2014 May 15.

Effect of optical clearing agents on optical coherence tomography images of cervical epithelium.

Gallwas J, Stanchi A, Ditsch N, Schwarz T, Dannecker C, Mueller S, Stepp H, Mortensen U.
Lasers Med Sci. 2015 Feb;30(2):517-25. doi: 10.1007/s10103-014-1674-5. Epub 2014 Dec 14.

10. Danksagung

An der Erstellung dieser Dissertation waren einige Menschen maßgeblich beteiligt. Für deren Mitarbeit und Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle nun ganz herzlich bedanken.

Ein besonders großer Dank gebührt meiner Doktormutter und Betreuerin Frau PD Dr. med. Julia Gallwas, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht und sie von Anfang bis Ende mit sehr großem Engagement betreut hat. Neben ihren alltäglichen Pflichten als Ärztin schaffte sie es stets sich Zeit für mich zu nehmen und stand mir mit zahlreichen kompetenten Anregungen und Lösungsvorschlägen bei der Studiendurchführung, sowie bei der Ausarbeitung und Korrektur dieser Dissertation zur Seite. Ich möchte mich zudem für ihre Geduld und das Vertrauen, das sie mir zu jeder Zeit entgegenbrachte, bedanken. Vielen lieben Dank für die vielen gemeinsam verbrachten Nachmittage, die stets erfüllt waren mit inspirierenden Gesprächen über die Dissertation, den ärztlichen Beruf und das Leben.

Ein großes Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Uwe Mortensen für die außerordentliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Studiendaten. Durch seine große Expertise und sein Wissen, trug er in entscheidendem Maße zur Auswahl und Anwendung der geeigneten statistischen Verfahren bei. Nur dank seiner Mitarbeit war die Auswertung der Daten in der hier vorliegenden Form, sowie die Interpretation der Ergebnisse möglich. Vielen herzlichen Dank auch für die Korrektur meiner Dissertation sowie für die große Hilfe bei der korrekten Formulierung der statistischen Texte. Für die vielen Arbeitsstunden, die anregenden Diskussionen und für sein zu jeder Zeit offenes Ohr bin ich unglaublich dankbar.

Desweiteren gebührt mein Dank auch Herrn Dr. Herbert Stepp aus dem Laser-Forschungslabors der Universität München, der mir besonders in der Anfangsphase bei der Einarbeitung in das OCT-Gerät sowie über den gesamten Zeitraum meiner Dissertation bei physikalischen und technischen Fragen zur Seite stand. Durch seine große Hilfsbereitschaft und seinen kreativen Ideen bezüglich der Datengewinnung und Auswertung half er uns in vielen Situationen mit seinen kompetenten Anmerkungen und Lösungsansätzen weiter.

Ein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Sven Mahner, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Ermöglichung dieser wissenschaftlichen Arbeit, sowie dem gesamten ärztlichen und pflegerischen Team des Campus Großhadern für die freundliche Unterstützung bei der Studiendurchführung.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Frau PD Dr. med. Susanna Müller aus dem pathologischen Institut bedanken, die mir bereitwillig bei der histologischen Auswertung

sowie der Dokumentation der histologischen Befunde mittels Photomikroskop weiterhalf. Durch ihr Entgegenkommen bei der Markierung der von uns mittels OCT erfassten Areale auf den histologischen Präparaten unterstützte und erleichterte sie unsere Arbeit ungemein.

Ein großer Dank gilt insbesondere allen Patientinnen, die sich zur Studienteilnahme bereitklärten und somit einen Beitrag zum Erkenntnisgewinn in der Medizin geleistet haben.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken, die mich auf meinem Lebensweg begleitet und unterstützt, sowie bei meinen Freunden, die mir jeder auf seine eigene Art und Weise, sei es durch die Hilfe bei der Formatierung der Arbeit oder schlichtweg durch die moralische Unterstützung eine unglaublich große Hilfe waren.

Eidesstattliche Versicherung

Anna Stanchi

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Die Wirkung von Essigsäure und optischer Clearingmittel auf optische
kohärenztomographische Aufnahmen des Zervixepithels
Ex vivo Studie an Konisationspräparaten“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Es gilt zu erwähnen, dass Herr Prof. Dr. Uwe Mortensen bei der statistischen Auswertung der
Studiendaten mit seinem Wissen und seiner Expertise maßgeblich mitgewirkt hat. Er
korrigierte die von mir verfassten Texte über die statistische Methodik und deren Ergebnisse
und half bei der Wahl der korrekten Formulierungen bezüglich der statistischen Fachsprache.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand